

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

Rôle des antigènes précoces du virus du polyome
et du virus SV40 dans l'oncogénèse.

par

Claude Asselin

Département de microbiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)



Avril 1985

TABLE DES MATIERES

Table des matières	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	ix
Résumé	x
 Introduction	 1
 Matériel et méthodes	 9
I. Plasmides	9
II. Méthode de mutagénèse et clonage	11
1. Méthode de clonage	11
2. Mutagénèse par insertion d'un adaptateur	12
3. Mutagénèse d'un site de restriction à la Klenow	12
4. Mutagénèse d'un site de restriction à la T4 ADN polymérase.	13
5. Mutagénèse à la nucléase Bal31	13
III. Transfection de cellules en culture	14
1. Cellules de rat Fischer 3T3 (FR3T3) (Seif et Cuzin, 1977) .	14
2. Cellules de rat primaires	15
i) Préparation des cellules	15
ii) Transfection des cellules primaires	
(Wigler et al., 1978)	16
IV. Vérification du potentiel tumorigène de l'ADN recombinant	17
V. Détermination de la séquence nucléotidique	17

iii) Le gène T moyen (pmt) peut immortaliser à une faible fréquence	61
iv) Un mutant de délétion du gène plt a un potentiel d'immortalisation accru et peut compléter le gène T moyen dans la tumorigénèse	62
II. Détermination de la région minimale du gène grand T de SV40 nécessaire à l'immortalisation	66
1. Description des mutants de délétion du gène grand T de SV40	66
2. Immortalisation de cellules primaires de rat avec les mutants de délétion du gène grand T de SV40	68
i) La région N-terminale de l'antigène grand T de SV40 est suffisante à l'immortalisation	68
ii) Un mutant du gène grand T de SV40, déficient dans le transport au noyau, peut transformer des cellules primaires de rat	77
Troisième partie: Le petit T et un mutant du gène grand T de polyome peuvent compléter le gène pmt dans la transformation de cellules primaires de de rat in vitro	79
Discussion	82
I. Activité oncogénique de l'antigène T moyen de polyome	82
II. Complémentation par le gène grand T de polyome	84
III. Complémentation par les antigènes précoces de SV40 et Ad2, et par l'oncogène cellulaire <u>myc</u>	87

IV. Complémentation par l'antigène petit T	89
V. Immortalisation de cellules primaires de rat avec des mutants de délétion des gènes grand T de polyome et de SV40 ..	92
Remerciements	99
Références	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Carte physique du génome du virus du polyome	6
Figure 2.	Structure de plasmides recombinants	10
Figure 3.	Activité tumorigénique des ADNs recombinants	22
Figure 4.	Croissance de certaines lignées transformées représentatives de polyome à haute et faible concentration de sérum	23
Figure 5.	Transplantation de certaines lignées transformées représentatives de polyome dans les souris nues	25
Figure 6.	Protéines virales synthétisées par les lignées cellulaires tumorales MLT9 et MST10	29
Figure 7.	Détection de l'antigène grand T de polyome par immunofluorescence	32
Figure 8.	Protéines virales synthétisées par des lignées cellulaires tumorales représentatives	35
Figure 9.	Diagramme des séquences de polyome et de SV40 liées au gène T moyen de polyome	36
Figure 10.	Protéines virales synthétisées dans les cellules transformées avec pMSV2 et pMSV2-a	41
Figure 11.	Structure des plasmides recombinants pMAd	43
Figure 12.	Analyse de restriction des mutants de délétion de plt	46
Figure 13.	Carte de restriction des mutants de délétion de plt	47

Figure 14.	Analyse de restriction des mutants de délétion de plt3 avec <u>Hpa</u> II	51
Figure 15.	Analyse de restriction des mutants de délétion de plt3 avec <u>Alu</u> I et <u>Hin</u> fI	52
Figure 16.	Carte de restriction des mutants de délétion de plt3 et pmt	53
Figure 17.	Coloration de cellules transfectées avec différents mutants de plt	56
Figure 18.	Immortalisation de cellules primaires avec les mutants de délétion de plt	58
Figure 19.	Photographies en contraste de phase (150X) de cellules immortalisées avec différents recombinants	63
Figure 20.	Autoradiogramme de la séquence du mutant plt-d197	65
Figure 21.	Analyse de restriction des mutants de délétion du gène grand T de SV40	69
Figure 22.	Carte de restriction des mutants de délétion du gène grand T de SV40	70
Figure 23.	Coloration des cellules transfectées avec différents mutants de délétion du gène grand T de SV40	72
Figure 24.	Immortalisation de cellules primaires avec les mutants de délétion du gène grand T de SV40	73
Figure 25.	Autoradiogramme de la séquence du mutant Xho24	74
Figure 26.	Protéines virales synthétisées dans une lignée immortalisée avec le mutant Xho24	76
Figure 27.	Coloration de cellules transfectées avec pMLT1, pMLTd197 et bc1051	80
Figure 28.	Comparaison des séquences des gènes grand T de SV40 et polyome et des mutants plt-d197 et Xho24	91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Transplantation de cellules transformées par l'ADN du virus du polyome	24
Tableau 2.	Pouvoir transformant et tumorigène d'ADNs recombinants du virus du polyome	28
Tableau 3.	Propriétés des lignées cellulaires transformées	33
Tableau 4.	Activité tumorigène des plasmides recombinants	39

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP	adénosine 5' triphosphate
BSA	albumine sérique bovine
Ci	curie
ddATP	didéoxy-adénosine 5' triphosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
dNTP	déoxy-nucléotide 5' triphosphate
DTT	dithiothréitol
EDTA	éthylène-diamine-tétraacétate de sodium
EGTA	acide éthylène glycol-bis (β -aminoéthyl éther)N,N,N',N'-tétraacétique.
Hepes	acide N-2-Hydroxyéthylpiperazine-N'-2-éthane sulfonique
K, KD	kilodalton
NP40	nonidet-P40
pb	paire de base
SDS	sodium dodécyl sulfate
Tris	tris(hydroxyméthyl) aminométhane
V/V, W/V	volume/volume, poids/volume

RESUME

Le gène T moyen du virus du polyome n'induit pas la formation de tumeurs chez le rat. Il est tumorigène chez le hamster après un long temps de latence et peut immortaliser des cellules primaires de rat à une faible fréquence. Des fonctions autres que celles exprimées par l'antigène T moyen sont requises pour l'élaboration de toutes les propriétés associées à la transformation néoplasique. Nous avons trouvé que le potentiel tumorigène du gène T moyen in vivo pouvait être restauré par des facteurs d'immortalisation tels que l'antigène grand T de SV40, la région E1A de Ad2, l'oncogène cellulaire myc et par un mutant du gène grand T de polyome, plt-dl97. Ce mutant, qui a une capacité accrue d'immortalisation, a une délétion en phase de 30 pb entre les nt 1367 et 1397 et est beaucoup plus efficace que le gène plt de type sauvage dans la complémentation du gène T moyen in vivo et in vitro.

Nous avons trouvé que le gène T moyen pouvait être complété par le petit T de polyome in vivo et in vitro. Même si, du point de vue opérationnel, le petit T de polyome est très similaire dans la tumorigénèse aux facteurs d'immortalisation, il ne peut être impliqué dans des fonctions d'établissement. Ceci suggère que tous les gènes qui complètent la fonction transformante du gène T moyen de polyome ne créent pas des changements identiques dans le comportement cellulaire mais peuvent, au contraire, interagir avec des cibles cellulaires différentes.

Nous avons trouvé que 27% de la région encodant le gène grand T de polyome, jusqu'au nt 1213, était suffisant à immortaliser des cellules primaires de rat. Nous avons identifié la région entre le nt 1016 (AvaI) et 1213, comme étant essentielle au processus d'immortalisation. Cette région ne comporte aucune homologie de séquence avec SV40 et serait d'origine cellulaire. Nous avons aussi trouvé qu'un mutant de délétion du gène grand T de SV40, Xho24, qui n'encode que les 137 premiers acides aminés, soit 19% de la protéine, pouvait immortaliser efficacement des cellules primaires de rat. Nous suggérons que les capacités d'immortalisation associées aux gènes grands T tronqués de polyome et de SV40 dépendent de la liaison de ces protéines à l'ADN cellulaire suivi d'un processus d'activation de gènes, même si nous avons montré que la présence dans le noyau d'un grand T de SV40 n'est pas toujours nécessaire à la transformation de cellules primaires.

INTRODUCTION

D'abord identifié comme agent responsable d'adénocarcinomes des glandes salivaires chez la souris (Gross, 1953a, 1953b), le virus du polyome doit son nom à sa capacité d'induire une grande variété de tumeurs chez différentes espèces d'animaux (Stewart et Eddy, 1959). C'est un virus membre de la famille des papovavirus comme SV40, BK et JC, donc un virus non enveloppé de symétrie icosahédrique (Tooze, 1981). Son génome consiste en une molécule d'ADN circulaire de 5292 pb, bicaténaire et surenroulée, associée à des histones cellulaires et entourée des protéines de la capsid. L'ADN viral est constitué d'une région non-codante comprenant l'origine de réplication et les signaux de transcription des 2 régions codantes, la région précoce et la région tardive. Celles-ci sont transcrites de part et d'autre de la région non-codante sur des brins complémentaires. La région tardive, transcrite après le début de la réplication de l'ADN viral, encode les 3 protéines de structure du virion, VP1, VP2 et VP3. La région précoce est transcrite avant le début de la réplication de l'ADN viral lors du cycle lytique. Elle encode les antigènes tumoraux T, d'abord mis en évidence par la présence d'anticorps anti-T dans le sérum d'animaux porteurs de tumeurs (Habel, 1965). L'organisation de la région précoce a été établie par l'analyse des antigènes T (Hutchinson et al., 1978; Smart et Ito, 1978), par l'analyse de la séquence d'ADN (Soeda et al., 1980) et par l'étude des sites d'épissage de l'ARN messager précoce dans des cellules transformées ou infectées lytiquement par le virus (Kamen et al., 1980; Treisman et al., 1981a). Trois protéines sont générées dans un même

fragment d'ADN par des événements d'épissage différents (Figure 1). Les antigènes grand T (100K), moyen T (56K) et petit T (22K) ont une extrémité N-terminale commune (nt 173 à 409, 79 acides aminés). Les antigènes petit T et T moyen ont une séquence complémentaire commune qui n'est pas partagée par l'antigène grand T, parce qu'elle est à l'intérieur de l'intron (nt 409 à 746, 112 acides aminés). Et chaque antigène T possède une région C-terminale unique, grâce à l'utilisation de trois cadres de lecture différents.

Les cellules qui peuvent être infectées par le virus sont dites permissives: elles permettent la réplication de l'ADN viral et produisent les protéines nécessaires à l'encapsidation, ce qui se termine par la lyse de la cellule. Les cellules de souris sont dans cette catégorie. D'autres cellules de rongeurs varient dans leur permissivité. Les cellules de hamster ou de rat sont semi-permissives puisqu'elles permettent un peu de réplication du génome viral et de production de virion. Cependant, une petite proportion de cellules stabilise l'ADN viral qui produit alors les protéines précoces. Ces cellules transformées acquièrent des propriétés nouvelles, soit la perte d'inhibition de contact, l'indépendance d'ancrage, une forte densité de saturation, la croissance à faible concentration de sérum, des changements de morphologie et la capacité de former des tumeurs dans des animaux syngéniques (Tooze, 1981). Ce type de cellules a permis d'utiliser le virus du polyome comme modèle d'étude de la tumorigénèse.

Dans le but de comprendre les fonctions des antigènes T dans la transformation, il est nécessaire de connaître leur localisation dans la cellule ainsi que certaines de leurs propriétés biochimiques. L'antigène grand T de polyome se retrouve dans le noyau (Silver et al., 1978), mais ni dans le nucléole, ni dans le cytoplasme (Griffin et Dilworth, 1983). La protéine grand T de SV40 se retrouve de plus associée à la membrane cellulaire (Deppert et Walter, 1982), ce qui ne semble pas être le cas de l'antigène grand T de polyome. Celui-ci est une phosphoprotéine formant des oligomères, capable de se lier à l'ADN bicaténaire (Gaudray et al., 1980), spécifiquement à l'origine de réplication et aux promoteurs des régions tardives et précoces (Gaudray et al., 1981; Pomerantz et al., 1983; Dilworth et al., 1984; Cowie et Kamen, 1984) et avec une faible affinité pour des séquences non-spécifiques. Il possède une activité ATPase intrinsèque (Gaudray et al., 1980) et est aussi impliqué dans la stimulation de synthèse de l'ADN cellulaire, dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral (Francke et Eckhart, 1973) et dans la répression de la transcription de la région précoce (Cogen, 1978). En plus de ces activités, l'antigène grand T de SV40 stimule la transcription des ARNr (May et al., 1976) et l'expression de la région tardive (Brady et al., 1984; Keller et Alwine, 1984). Il forme un complexe stable avec la protéine cellulaire p53 (Lane et Crawford, 1979; Linzer et Levine, 1979), permet la croissance de l'adénovirus type 2 dans des cellules de singe, grâce à une fonction "helper" (Grodzicker et al., 1977) et peut se lier de façon spécifique à de l'ADN cellulaire (Wright et al., 1984).

L'antigène T moyen est localisé dans la fraction membranaire de la cellule (Ito et al., 1977), plus particulièrement au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique, et est aussi périnucléaire (Zhu et al., 1984). La protéine T moyen n'a pas d'équivalent chez SV40. Bien qu'elle ne soit pas très phosphorylée *in vivo*, elle agit comme accepteur dans une réaction tyrosine kinase *in vitro* (Eckhart et al., 1979; Schaffhausen et Benjamin, 1979; Smith et al., 1979). Cette réaction est due au produit du gène cellulaire c-src qui forme un complexe à la membrane avec le T moyen (Courtneidge et Smith, 1983, 1984). L'interaction entre l'antigène T moyen et la pp60^{c-src} stimulerait l'activité tyrosil kinase de la protéine (Bolen et al., 1984). En plus d'un rôle primordial dans la transformation (voir plus loin), le T moyen serait important dans l'assemblage du virion (Garcea et Benjamin, 1983).

L'antigène petit T est présent dans le cytoplasme et dans le noyau (Zhu et al., 1984) comme la protéine petit T de SV40 (Montano et al., 1984). Le petit T de polyome semble réduire l'attachement des cellules au plastique en changeant la structure du cytosquelette cellulaire (Zhu et al., 1984; Cuzin, 1984). Il a aussi un effet mitogénique sur des cellules à confluence et induit l'agglutinabilité par les lectines (Liang et al., 1984). Le petit T de SV40 induit la dissociation du réseau des câbles d'actine (Graessman et al., 1980; Bikel et al., 1983). Il peut s'associer à deux protéines cellulaires de 56 KD et de 32 KD respectivement (Rundell, 1982) et semble responsable de la stimulation de la synthèse de l'antigène centriolaire de la cellule (Shyamala et al., 1982).

L'analyse des propriétés biologiques de certains mutants du virus du polyome (Figure 1) a permis d'élucider le rôle des antigènes tumoraux dans la transformation. Les mutants ts, obtenus par mutagénèse à l'acide nitreux, affectent la protéine grand T qui est rapidement détruite à la température restrictive (39°C). Habituellement, les cellules transformées par ces mutants à la température permissive (33°C) restent transformées à la température restrictive (39°C) (Fried, 1965; Eckhart, 1969; Di Mayorca et al., 1969). Ces résultats suggèrent qu'une fonction de grand T est nécessaire à l'établissement de l'état transformé, non à son maintien. Cependant, Seif et Cuzin (1977) ont réussi à isoler deux types de transformants selon leur capacité à former des foyers sur plastique (type N) ou à former des colonies en agar (type A). Les transformants de type A ne sont pas thermosensibles pour le maintien de la transformation alors que les transformants de type N révertent à un phénotype apparemment normal à la température restrictive. Dans les deux cas, une fonction de maintien de l'état transformé serait assumée par l'antigène grand T, soit par la protéine complète thermosensible (type N), soit par des formes tronquées (type A) (Rassoulzadegan et al., 1979, 1981).

Les mutants hr-t (host-range nontransforming) ont d'abord été sélectionnés pour leur capacité de croissance dans des cellules de souris 3T3 transformées par le virus du polyome et pour leur incapacité de croître dans des cellules non-transformées (Benjamin, 1970). Cette classe de mutants affecte seulement les antigènes petit T et T moyen (Hattori et al., 1979; Carmichael et Benjamin, 1980). Ceux-ci complètent les mutants ts pour la croissance et la transformation (Fluck et al., 1977) et ne sont pas tumorigènes.

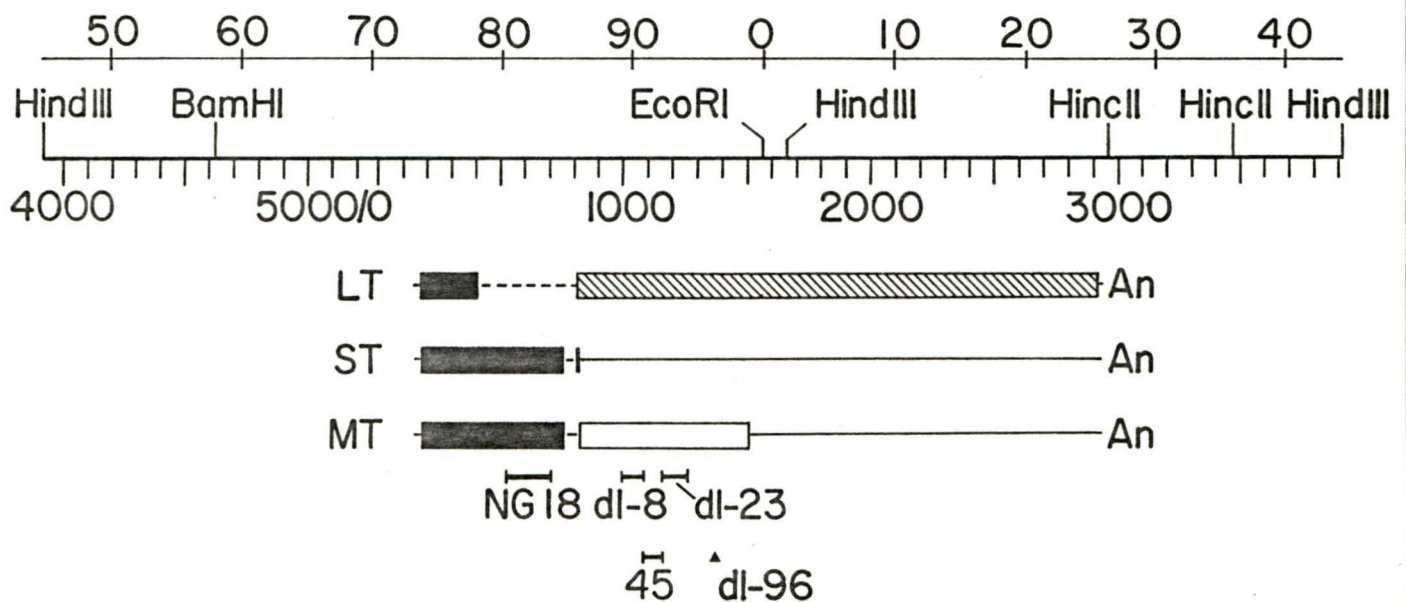


FIG. 1. Carte physique du génome du virus du polyome linéarisé au site HindIII (3918). Les séquences encodant les 3 antigènes tumoraux (ST, MT, LT) sont représentées. La région N-terminale commune aux 3 protéines précoces est illustrée en noir, alors que les séquences uniques aux antigènes ST, MT et LT sont illustrées respectivement en noir, blanc et en hachuré. Nous avons également représenté les régions qui sont affectées par les différents groupes de mutants: hr-t, ml-t, ts et cs.

Contrairement aux mutants hr-t, les mutants ml-t, qui ont des lésions affectant à la fois les antigènes grand T et T moyen, varient considérablement dans leur phénotype. Par exemple, dl-8 se réplique difficilement mais transforme des cellules en culture alors que le mutant dl-23 ne transforme pas même s'il croît très bien in vitro (Griffin et Maddock, 1979; Griffin et al., 1980). De nombreux autres mutants ml-t ont été isolés (Magnusson et Berg, 1979; Bendig et al., 1980; Magnusson et al., 1981; Smolar et Griffin, 1981; Ding et al., 1982; Gélinas et al., 1982).

L'étude des propriétés biologiques de divers mutants a permis de démontrer que la protéine grand T complète n'est ni suffisante ni nécessaire à l'expression d'un phénotype complètement transformé (Israël et al., 1979a, 1979b; Hassell et al., 1980; Novak et al., 1980) et que l'antigène T moyen seul est suffisant à l'expression du phénotype transformé (Novak et Griffin, 1981; Carmichael et al., 1982; Mes et Hassell, 1982; Templeton et Eckhart, 1982). L'utilisation d'un ADNc n'encodant que la protéine T moyen a clairement établi le rôle essentiel de celle-ci dans la transformation (Treisman et al., 1981b).

Dans ce travail, nous montrons que même si T moyen est suffisant pour transformer des cellules en culture, celui-ci n'est pas tumorigène chez le rat in vivo et peut induire des tumeurs chez le hamster après un long temps de latence. Nous montrons aussi que l'antigène T moyen nécessite le petit T pour restaurer son pouvoir tumorigène in vivo. On obtient un effet analogue avec d'autres gènes viraux ou cellulaires, tels que l'antigène grand T de SV40, les produits

de la région E1A de l'adénovirus 2 et l'oncogène cellulaire myc. Ces trois derniers gènes permettent à des cellules primaires de rat d'acquérir un potentiel illimité de croissance en culture (immortalisation) (Houweling et al., 1980; Clayton et al., 1982; Colby et Shenk, 1982; Petit et al., 1982; Rassoulzadegan et al., 1983; Mougneau et al., 1984). Dans le but de définir la nature de la complémentation entre le gène T moyen et des gènes immortalisants, nous avons introduit des délétions dans les gènes grand T de SV40 et polyome. Nous montrons que 19% de l'antigène grand T de SV40 et moins de 25% de celui de polyome sont suffisants pour immortaliser des cellules primaires. Nous décrivons aussi un mutant du gène grand T de polyome, plt-dl97, qui immortalise des cellules primaires de rat avec une plus grande efficacité que le gène de type sauvage et qui peut compléter le gène T moyen dans la tumorigénèse.

MATERIEL ET METHODES

I. Plasmides.

pMT3 est un recombinant n'encodant que l'antigène T moyen (Asselin et al., 1983) (Voir figure 2). Il provient de la délétion de deux fragments HindIII de pPyMT1 (Treisman et al., 1981b). bc1051 est un génome modifié du virus du polyome ne produisant que les antigènes petit T et T moyen suite à un changement de base ($G \rightarrow A$) au nt 410, qui empêche l'épissage de l'ARNm de l'antigène grand T (Nilsson et Magnusson, 1983). NG-18 est un mutant hr-t du virus du polyome avec une délétion de 187 pb qui inactive les gènes petit T et T moyen (Hattori et al., 1979). pLT1 est un recombinant n'encodant que l'antigène grand T du virus du polyome et pST1, que l'antigène petit T (Treisman et al., 1981a). Δ2005 est un mutant de SV40 avec une délétion de 230 pb qui inactive la protéine petit T mais laisse intacte la région codante de l'antigène grand T (Sleigh et al., 1978). pAd2-9 contient la région E1A et E1B de l'adénovirus 2 (les premiers 9.1% jusqu'au site Bgl II), insérée dans le site PstI de pBR322. pSVc-myc-1 est constitué d'un fragment XbaI-BamHI de 4.8 Kb contenant les 2^e et 3^e exons du gène cellulaire myc de souris sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 (Land et al., 1983). pSV2neo est un plasmide qui encode l'aminoglycoside phosphotransférase de l'élément transposable Tn5 de Escherichia coli, sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 (Southern et Berg, 1982).

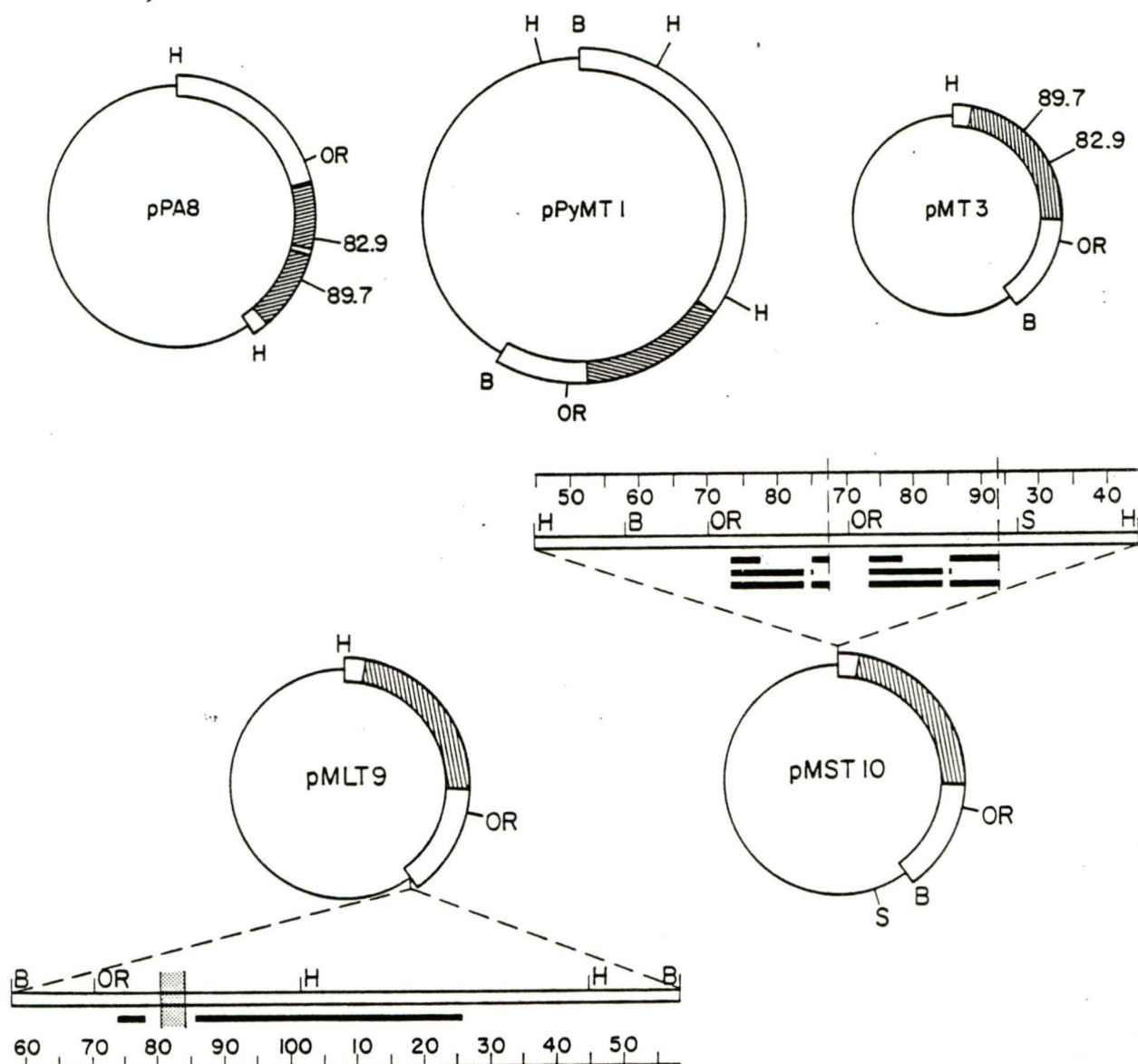


FIG. 2. Structure de plasmides recombinants. Les fragments d'ADN du virus du polyome sont représentés encadrés et sont insérés dans pBR322 (pPA8) ou dans pAT153 (autres plasmides). Les régions hachurées représentent la région encodant l'antigène T moyen. pMT3 a été obtenu par délétion de deux fragments HindIII à partir de pPyMT1. Les deux sites AvaI à 82.9 et 89.7 de pPA8 et pMT3 sont indiqués. pMLT9 a été obtenu en insérant le génome de NG-18 dans le site BamHI de pMT3. La région encodant l'antigène grand T est indiquée. La délétion dans l'intron de grand T est représentée par la région tachetée. pMST10 a été construit en insérant une molécule défective du virus du polyome (Parent et Bastin, 1981) dans le site HindIII de pMT3. Les régions codant pour les trois antigènes T sont indiquées. Le m.u. correspond aux unités d'un génome complet du virus du polyome divisé en 100 U à partir du site EcoRI. Abréviations: H, HindIII; B, BamHI; S, Sall; OR, origine.

II. Méthodes de mutagénèse et de clonage.

1. Méthode de clonage.

Le vecteur est digéré dans 20 μ l de tampon de restriction (10 mM Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) avec 1 à 2 U d'enzyme de restriction (BRL, Amersham, Boehringer-Mannheim) par μ g d'ADN pendant 2 à 3 heures à 37°C. Trente minutes avant la fin de la digestion, on ajoute 0.4 μ l (8 U) de phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIAP, Boehringer-Mannheim) et on incube 30 minutes à 37°C. On ajoute alors 65 μ l d'eau distillée, 10 μ l de STE 10X (100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 M NaCl, 10 mM EDTA) et 5 μ l de SDS à 10%. La solution est chauffée à 68°C pendant 15 minutes. Cette étape est suivie d'une extraction au phénol: chloroforme-alcool isoamylique 24:1 (1:1) et d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique 24:1. L'ADN est alors précipité avec 2 volumes d'éthanol, 15 minutes à -70°C.

Le fragment à cloner est extrait d'un gel d'agarose fondant à 1%. On ajoute au morceau de gel 200 μ l TE (1 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) et on le chauffe pendant 5 minutes à 70°C pour faire fondre l'agarose. L'agarose fondu est extrait une fois avec un volume égal de phénol à la température de la pièce. Après centrifugation, la phase aqueuse est réextraite avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique 24:1 et l'ADN est ensuite précipité à l'éthanol.

La ligation se fait à la température de la pièce pendant 2 à 4 heures dans 20 μ l de tampon de ligation (0.05 M Tris-Cl (pH 7.4), 0.01 M MgCl_2 , 0.01 M DTT, 1 mM spermidine, 1 mM ATP, 0.1 mg/ml BSA) contenant 2 U de T4 ADN ligase (Boehringer-Mannheim). Les transformations bactériennes se font selon la méthode de Cohen et al. (1972) dans la souche Escherichia coli HB101 (Boyer et Roulland-Dussoix, 1969). La préparation des plasmides recombinants est effectuée selon les différentes méthodes décrites par Maniatis et al. (1982).

2. Mutagenèse par insertion d'un adaptateur.

La phosphorylation de l'adaptateur XhoI de 8pb (5'dCdC + dT dCdGdAdGdG-3', P-L Biochemicals) s'effectue dans 10 μ l de tampon de kinase (0.066 M Tris-Cl (pH 7.6), 1 mM ATP, 1 mM spermidine, 0.01 M MgCl_2 , 15 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA) avec 2 μ g d'adaptateur et 2 à 4 U de T4 ADN kinase (BRL) pendant 1 heure à 37°C. Après l'incubation, le fragment de restriction à bouts francs est ajouté (10 μ l) et ligaturé avec 3 U de T4 ADN ligase à 14°C pendant la nuit.

3. Mutagenèse d'un site de restriction à la Klenow.

Les extrémités 5' libres de l'ADN peuvent être comblées en utilisant l'activité ADN polymérase du fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de Escherichia coli. L'ADN (1 à 2 μ g) est incubé à la température de la pièce pendant 20 minutes dans 30 μ l de tampon de "nick-translation" (0.05 M Tris-Cl (pH 7.2), 0.01 M MgSO_4 , 0.1 mM DTT, 0.05 mg/ml BSA) contenant 1 μ l de chacun des 4 dNTPs (solution-stock de

10 mM) et 4 U du fragment de Klenow. La réaction est arrêtée par extraction au phénol et l'ADN est alors précipité à l'éthanol et ligaturé.

4. Mutagenèse d'un site de restriction à la T4 ADN polymérase.

Les extrémités 3' libres de l'ADN peuvent être enlevées en utilisant l'activité 3' exonucléasique de l'ADN polymérase du bactériophage T4. En présence des 4 dNTPs, la polymérase va ôter les extrémités 3' monocaténaïres et va s'arrêter en atteignant la première base appariée si le dNTP complémentaire approprié est présent. Le fragment de restriction (1 à 2 µg) est incubé pendant 5 minutes à 37°C dans 20 µl de tampon de polymérase T4 (0.033 M Tris acétate (pH 7.9), 0.066 M acétate de potassium, 0.01 M acétate de magnésium, 0.5 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) contenant aussi 1 µl de chacun des 4 dNTPs (solution-stock de 10 mM) et 2 à 4 U de T4 ADN polymérase. La réaction est arrêtée par addition de 2 µl de EDTA 0.2 M et par une extraction au phénol: chloroforme-alcool isoamylique 24:1 (1:1). L'ADN est précipité à l'éthanol et ligaturé.

5. Mutagenèse à la nucléase Bal 31.

La nucléase Bal 31 dégrade les brins 3' et 5' de l'ADN. Dans des conditions idéales, un ADN linéaire peut être digéré à partir de ses deux extrémités d'une façon contrôlée. Le fragment linéarisé (2 µg) est incubé de 30 secondes à 4 minutes, selon la délétion désirée, à 30°C dans 50 µl de tampon Bal 31 (20 mM Tris-Cl (pH 8.0), 600 mM NaCl, 12.5

mM CaCl_2 , 12.5 mM MgCl_2) préchauffé à 30°C pendant une minute et contenant 1 U de nucléase Bal 31 (BRL). La réaction est arrêtée avec 3 μl de EDTA 0.2 M, 3 μl de EGTA 0.1 M et 50 μl de phénol, à 0°C . L'ADN est centrifugé, précipité à l'éthanol après avoir dilué le volume trois fois, et ligaturé. La ligation se fait à 20°C pendant 2 à 3 heures sans avoir préalablement traité les extrémités à la Klenow. En effet, en tout temps, 20% des molécules générées à la nucléase Bal 31 ont des bouts francs.

III. Transfection de cellules en culture.

1. Cellules de rat Fischer 3T3 (FR3T3) (Seif et Cuzin, 1977).

Les cellules sont cultivées dans un milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10% de sérum de veau foetal, 1% d'antibiotique (streptomycine 0.01%, pénicilline 100 U/ml) et 2% de fongizone (amphotéricine B, 2.5 $\mu\text{g/ml}$). La transfection est effectuée selon la méthode de Stow et Wilkie (1976). Brièvement, on ajoute à l'ADN recombinant 0.45 ml d'ADN de thymus de veau à une concentration de 10 μg par ml de tampon Hebs (0.14 M NaCl, 5 mM KCl, 0.7 M Na_2HPO_4 , 5.5 mM glucose, 20 mM Hepes (pH 7.05)), 0.1 ml d'aprotinine et 35 μl de CaCl_2 2 M. Après agitation vigoureuse, on laisse le précipité se former pendant 10 minutes à la température de la pièce. Celui-ci est resuspendu et versé dans un pétri de 60 mm préalablement vidé de son milieu et contenant approximativement 500,000 cellules. Après 30 minutes à 37°C , on ajoute 5 ml de DMEM complet et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 5 à 6 heures dans une atmosphère contenant 5% CO_2 . Les cellules

sont lavées une fois avec du DMEM et on ajoute 1 ml de DMEM contenant 20% de DMSO durant 40 secondes. Les cellules sont ensuite rincées rapidement 3 fois avec du DMEM complet. On ajoute 5 ml de milieu et on incube les boîtes pendant 36 heures à 33°C (CO₂ 10%). Après trypsinisation, les cellules sont distribuées à raison de 50,000 cellules par pétri de 60 mm et incubées à 39°C pendant 10 jours (CO₂ 10%). Les foyers sont prélevés après 2 à 3 semaines.

2. Cellules de rat primaires.

- Préparation des cellules.

Les embryons de rat Fischer de 15 jours sont lavés trois fois dans une solution de Tris-salin, coupés et trypsinisés avec de la trypsine 0.06% (75 ml Tris-salin + 25 ml trypsine 0.25%) à 37°C, avec agitation constante pendant 20 minutes. Les cellules sont filtrées à travers une gaze et sont recueillies dans du sérum de veau foetal pur (30 à 50 ml). Après centrifugation à 1800 rpm pendant 10 minutes, les cellules sont comptées au bleu de trypan (1:3). On ensemence 3 X 10⁶ cellules par pétri de 60 mm dans du DMEM complet avec 10% de sérum de veau foetal et on incube à 37°C pendant 20 à 24 heures, jusqu'à ce que les cellules aient atteint 30 à 50% de confluence.

- Transfection des cellules primaires (Wigler et al., 1978).

Le milieu est changé 4 heures avant la transfection. Dans un tube eppendorf, on met 250 μ l de Hebs 2X (50 mM Hepes (pH 7.12), 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4). Dans un autre tube, on ajoute à l'ADN recombinant (8 μ g dans 12 μ l TE (1 mM Tris (pH 8.0), 0.1 mM EDTA)), 175 μ l d'ADN de thymus de veau (10 μ g dans 175 μ l TE 1/10) et 63 μ l CaCl_2 1M. La solution d'ADN est ajoutée pendant 30 secondes dans la solution de Hebs 2X, avec agitation constante produite en introduisant lentement des bulles d'air (bubbling). Après 30 minutes à la température de la pièce, le précipité est ajouté à une boîte de 60 mm contenant 5 ml de DMEM avec 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 24 heures et ensuite divisées de façon à avoir une confluence de 20 à 30%. Pour l'essai d'immortalisation, on applique la sélection au G-418 (Gibco) après 18 heures à 37°C, en remplaçant le milieu avec du DMEM complet contenant 400 μ g/ml de G-418. Le milieu est changé tous les 5 jours et les clones sont recueillis après 3 à 4 semaines. L'expression de la phosphotransférase de Tn5 confère aux cellules la résistance à l'aminoglycoside toxique G-418 (Southern et Berg, 1982). Les clones résistants sont choisis sans tenir compte de leur morphologie dans la mesure du possible, et passés dans un puits de 1.67 cm^2 de surface (Linbro, Flow Laboratories) contenant 1 ml de DMEM complet avec 400 μ g/ml de G-418. Les cellules ayant atteint la confluence sont passées 1:5 pendant au moins 10 passages, pour s'assurer de leur immortalité.

IV. Vérification du potentiel tumorigène de l'ADN recombinant.

Dans le but de vérifier l'activité biologique des recombinants, on injecte de façon sous-cutanée dans le cou de rats Fischer nouveau-nés (Charles River, Canada Inc., CDF (F-344) Cr IBR), 2 µg d'ADN linéarisé à l'aide d'enzymes de restriction et dilué dans 50 µl de PBS (phosphate-buffered saline). Les animaux sont observés régulièrement pendant 5 mois.

Pour évaluer la tumorigénicité des lignées cellulaires transformées, les cellules sont recueillies par trypsinisation. 10^4 à 10^5 cellules lavées et resuspendues dans 0.05 à 0.1 ml de PBS sont injectées à un seul site d'injection sous-cutanée dans de jeunes rats Fischer ou des souris nues. Les animaux sont observés à toutes les semaines pendant 1 à 2 mois.

V. Détermination de la séquence nucléotidique.

Le fragment d'ADN à séquencer est marqué à ses extrémités à l'aide de la transférase terminale (Amersham) et d'un $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP (Amersham) (Yousaf et al., 1984). Brièvement, le mélange réactionnel contient 125 µCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP, environ 10 pmoles d'extrémités 5' ou 3' et 10 U de transférase terminale dans un volume final de 50 µl. Le tampon contient 140 mM de cacodylate de sodium (pH 7.2), 1 mM CoCl_2 , 0.1 mM DTT. La réaction est effectuée à 37°C pendant 1 heure et est arrêtée par l'addition de 5 µl EDTA 0.2 M. Après avoir complété le volume à 200 µl avec du TE, on fait une extraction avec un volume de

chloroforme-alcool isoamylique 24:1. Le fragment est ensuite précipité à -20°C avec 2 volumes d'éthanol en ajustant la concentration en NaCl à 0.2 M. Après centrifugation, il est digéré avec un enzyme de restriction pour éviter le double marquage. Le fragment marqué est isolé et séparé des triphosphates libres sur gel de polyacrylamide à 4% et extrait du gel selon la méthode utilisée par Céline Gélinas (1984). Le fragment est ensuite séquencé par dégradation chimique selon la technique de Maxam et Gilbert (1980) avec les modifications telles que décrites par Céline Gélinas (1984).

VI. Analyse des antigènes T dans les cellules transformées.

1. Immunofluorescence (Basilico et al., 1970).

On ensemence les cellules sur une lame porte-objets. Lorsqu'elles ont atteint 30 à 40 % de confluence, elles sont lavées au PBSA et ensuite fixées dans un mélange acétone-méthanol 2:1 pendant 15 minutes à -20°C . Après avoir séché 30 minutes à la température de la pièce, les lames sont rincées au TBS (25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.5 mM MgCl_2 , 0.14 M NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 0.7 mM CaCl_2). Sur chaque zone de croissance choisie, on ajoute une goutte d'antisérum de rat (anti-T) dilué 1:10 avec du TBS et on incube 45 minutes à la température de la pièce dans une atmosphère humide. Les lames sont lavées trois fois dans du TBS. Après avoir séché le contour du champ, on ajoute une goutte d'antisérum (anti-rat IgG) marqué à la fluorescéine (Miles) dilué dans du TBS (1:60). Après une incubation de 45 minutes à la température de la pièce, les lames sont lavées trois fois avec du TBS. On ajoute alors une

goutte de glycérol-TBS (1:1) et on couvre avec une lamelle. Les lames sont observées avec un microscope à fluorescence et peuvent être conservées à 4°C à l'obscurité.

2. Immunoprécipitation (Schaffhausen et Benjamin, 1979, 1981).

Cette technique permet d'immunoprécipiter les antigènes tumoraux des cellules transformées marquées à la [³⁵S]-méthionine. Les cellules à 80% de confluence dans une boîte de 60 mm sont lavées 2 fois avec une solution de PBS⁺ (0.17 M NaCl, 3.3 mM KCl, 0.01 M Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 7 mM CaCl₂, pH 6.8). Elles sont marquées pendant 90 minutes à 37°C dans 1 ml de milieu Hanks (Flow) contenant 100 µCi de [³⁵S]-méthionine (Amersham). Les cellules sont d'abord lavées avec 5 ml de PBS⁺ froid, ensuite avec le tampon de lavage pH 9.0 (20 mM Tris (pH 9.0), 137 mM NaCl, 0.92 mM CaCl₂, 0.49 mM MgCl₂). Après avoir bien enlevé le tampon de lavage, on extrait les antigènes T avec 1 ml de tampon d'extraction TEB pH 9.0 (89 ml de tampon de lavage, 10 ml de glycérol et 1 ml de NP40). Les pétris sont agités toutes les 5 minutes, pendant 20 minutes à 4°C. Les extraits sont alors transférés dans des tubes eppendorf et centrifugés pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est recueilli dans un tube conique de 15 ml (Sarstedt). On ajoute 10 µl de sérum anti-T et 30 µl de protéine A-sépharose 50% V/V (Pharmacia) préalablement hydratée et lavée 6 fois dans de l'eau bidistillée à 4°C. La réaction se poursuit pendant 40 minutes, en agitant les tubes régulièrement sur la glace afin de garder la protéine A-sépharose en suspension. Afin d'éliminer les protéines marquées non-spécifiques à l'antisérum, on lave 2 fois avec 5 ml de PBS⁺, 2 fois avec 5 ml de la

solution de lavage au LiCl pH 9.0 (0.1 M Tris (pH 9.0), 0.5 M LiCl) et une fois avec 5 ml d'eau distillée. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 4°C jusqu'à ce que la vitesse atteigne 2000 rpm (RC-4, Sorvall). Le culot est enfin resuspendu dans 40 µl de tampon de dissociation (5% (W/V) de SDS, 5% (V/V) de 2-mercaptoéthanol, 20% (V/V) de glycérol, 125 mM Tris-Cl (pH 6.8), 0.0075% (W/V) de bleu de bromophénol). Le tampon de dissociation ne doit être ajouté qu'au moment où les échantillons sont prêts à être bouillis, puisque la présence de SDS augmente la susceptibilité des protéines aux protéases. Les échantillons sont alors bouillis pendant 2 minutes et déposés sur un gel de SDS-polyacrylamide à 10% ou 12.5% (Laemmli, 1970).

L'électrophorèse se fait à 50 volts durant la nuit. Le lendemain, le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution contenant 5% (V/V) de méthanol et 7.5% (V/V) d'acide acétique. Le gel est ensuite trempé dans une solution d'Amplify (Amersham) pendant 30 minutes avec agitation constante, à la température de la pièce, séché sous vide, puis exposé à -70°C sur un film Kodak XAR-5 ou Cunix RP1 (Gevaert) avec écran.

RESULTATS

Première partie

Complémentation entre le gène T moyen de polyome et d'autres oncogènes dans la tumorigénèse.

Le gène T moyen (pmt) est suffisant à la transformation de cellules en culture (Treisman et al., 1981a). Il ne peut pas induire de tumeurs une fois injecté à des rats nouveau-nés mais il est tumorigène chez le hamster après une période de latence de plus de 5 mois (Figure 3) (Asselin et al., 1984). En collaboration avec Céline Gélinas, nous avons montré que le phénotype de cellules de rat FR3T3 transformées avec le gène pmt était variable (Asselin et al., 1983). Certaines lignées, comme MT3-9, croissent à haute densité même à faible concentration de sérum (0.5%) (Figure 4) et sont très tumorigènes, à la fois chez les rats Fischer et les souris nues (Tableau 1). La plupart des lignées (9/10) n'atteignent pas de hautes densités de saturation mais s'arrêtent à confluence dans 0.5% de sérum (Figure 4, MT3-4) et sont peu tumorigènes (Tableau 1, Figure 5). L'autre extrême est démontré par la lignée cellulaire MT3-8. Celle-ci ne pousse pas à faible concentration de sérum (Figure 4), comme une lignée non-transformée, et est très peu tumorigène chez la souris nue (1 tumeur sur 17 après 2 mois, Figure 5). Ces résultats indiquent que des fonctions autres que celles exprimées par la protéine T moyen sont requises pour l'expression d'un phénotype complètement transformé.

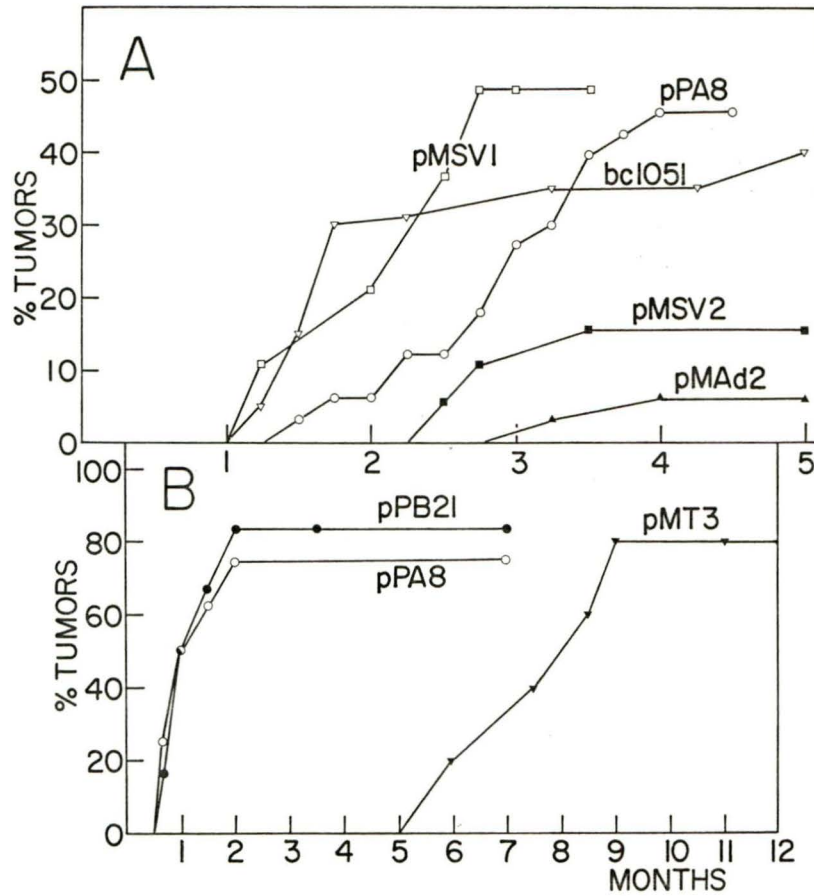


FIG. 3. Activité tumorigénique des ADNs recombinants. (A) Des rats nouveau-nés ont été injectés avec 2 μ g d'ADN plasmidique linéaire; (B) des hamsters nouveau-nés ont été inoculés avec 2 μ g d'ADN plasmidique linéaire. pPA8 (O) et pMT3 (\blacktriangledown) ont été coupés par HindIII; pPB21 (\bullet) a été coupé par BamHI.

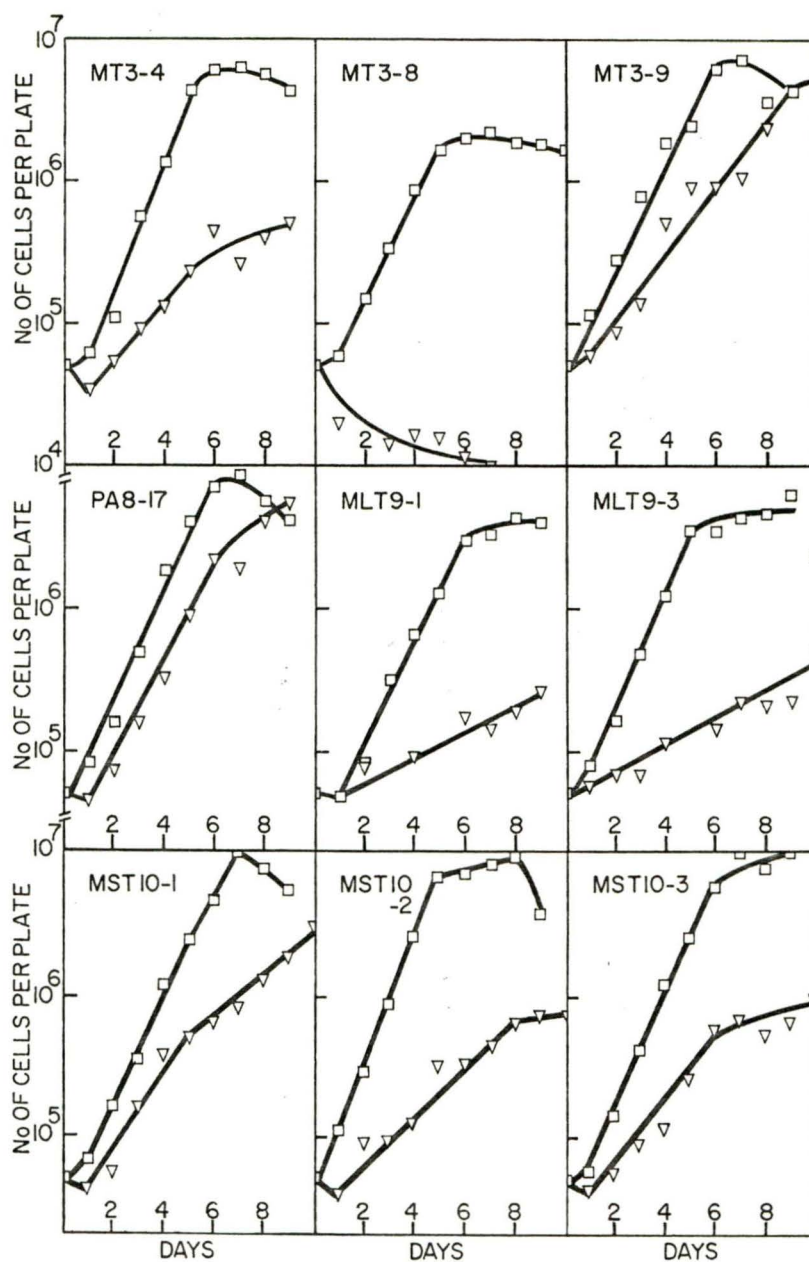


FIG. 4. Croissance de certaines lignées transformées représentatives de polyome à haute et faible concentration de sérum. Les cellules ont été distribuées à une densité de 5×10^4 cellules par pètri de 60 mm dans du DMEM contenant 10% (\square) ou 0.5% (∇) de sérum de veau foetal. Aux temps indiqués, les cellules ont été trypsinisées et comptées.

TABLEAU 1. Transplantation de cellules transformées par l'ADN du virus du polyome.

Lignée cellulaire ^a	Nombre de passages	Nombre de tumeurs				
		Rats Fischer		Souris nues		
		5x10 ⁴	10 ⁴	5x10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁴
PA8-2		-	4/18	-	10/10	13/27
PA8-3		6/10	7/24	-	8/8	5/6
PA8-16	(9)	-	-	-	5/6	-
PA8-18	(9)	-	-	-	5/5	-
PA8-13	(10)	-	3/5	-	-	-
MT3-9	(8)	10/11	-	9/9	-	-
MT3-4	(10,14)	0/5	0/17	6/21	2/8	-
MT3-8	(8,12)	0/7	0/6	0/17	-	-
MT3-3	(10)	-	-	3/10	-	-
MST10-1	(7,11)	22/24	3/8	10/10	-	-
MST10-2	(8,11)	4/14	-	3/3	4/4	-
MST10-3	(9,10)	5/6	-	5/5	4/4	-
MLT9-1	(8)	4/5	-	7/7 ^c	-	-
MLT9-3	(9)	4/5	-	5/5 ^c	-	-

^a Les cellules de la série PA8 ont été transformées avec le plasmide pPA8. Les lignées cellulaires PA8-2 et PA8-3 ont été injectées entre le 10^e et le 15^e passage. Les cellules de la série MT3 ont été transformées avec pMT3, le clone T moyen. Les cellules de la série MST10 ont été transformées avec pMST10, le clone T moyen lié à la région encodant l'antigène petit T de polyome. Les cellules de la série MLT9 ont été transformées avec pMLT9, le clone T moyen lié à la région encodant l'antigène grand T de polyome. Le nombre de passages des lignées cellulaires analysées, s'il est connu, est indiqué entre parenthèses.

^b Des jeunes rats Fischer adultes et des souris nues ont été injectés de façon sous-cutanée dans les flancs avec le nombre indiqué de cellules transformées dans 0.1 ml de PBS par animal.

^c Toutes les tumeurs sont apparues dans les 15 jours suivant l'injection.

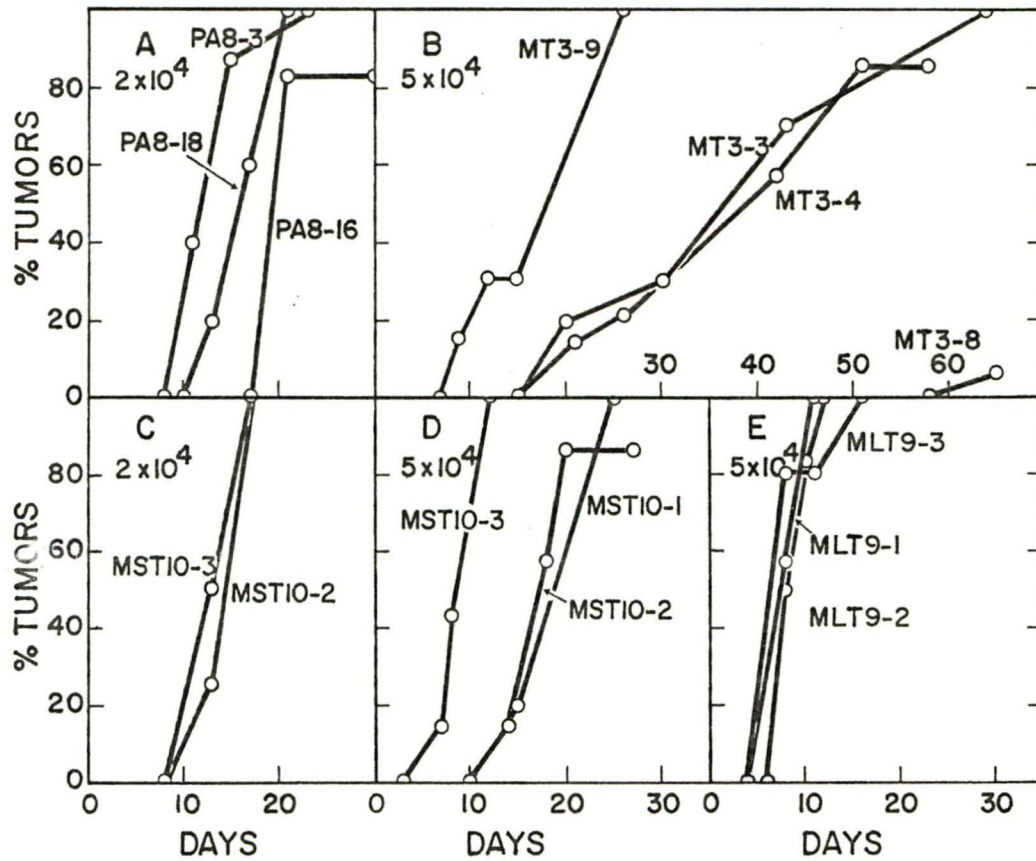


FIG. 5. Transplantation de certaines lignées transformées représentatives de polyome dans les souris nues. La quantité de cellules indiquée, resuspendue dans 0.05 à 0.1 ml de PBS, a été injectée à un seul site sous-cutané. Les cellules ont été considérées tumorigènes quand un nodule palpable est apparu au site d'inoculation. (A) 2×10^4 cellules pPA8; (B) 5×10^4 cellules MT3; (C) 2×10^4 cellules MST10; (D) 5×10^4 cellules MST10; (E) 5×10^4 cellules MLT9.

Dans le but de définir les fonctions qui peuvent compléter le gène pmt dans la tumorigénèse, nous avons construit divers recombinants en suppléant différents oncogènes viraux ou cellulaires au gène pmt. Nous avons évalué leur potentiel tumorigène en injectant l'ADN à des rats nouveau-nés ou en mesurant la croissance à faible concentration de sérum et la tumorigénicité de cellules transformées in vitro.

I. Complémentation avec des séquences encodant des fragments de l'antigène grand T ou l'antigène petit T du virus du polyome.

Des observations récentes ont montré que la région N-terminale du gène grand T (plt) était essentielle au maintien de l'état transformé dans des lignées cellulaires obtenues par infection de cellules FR3T3 avec le mutant ts-A du virus du polyome (Rassoulzadegan et al., 1981, 1982). Ces résultats suggèrent la possibilité qu'une fonction exercée par l'antigène grand T est nécessaire à la tumorigénèse. Pour déterminer l'importance du grand T dans la tumorigénèse, nous avons essayé de restaurer le potentiel tumorigène de pMT3 (gène pmt) par coinjection de séquences d'ADN encodant divers produits de la région précoce de polyome. Les séquences codant pour l'antigène grand T ont été fournies par le gène plt dans pPyLT1 (Treisman et al., 1981b) et par le mutant hr-t NG-18, avec une délétion de 187 pb qui enlève une partie de la région encodant les antigènes petit T et T moyen et change le cadre de lecture en aval de la délétion (Benjamin et al., 1979). Nous avons inséré le fragment BamHI des deux génomes dans le site BamHI de pMT3, dans une orientation tête-à-queue, pour donner pMLT9 et pMLT1 (Figure 2,

9). Pour suppléer le gène pmt avec 25% de la région N-terminale de la protéine grand T, nous avons cloné une molécule défective du virus du polyome, pHdf55 (Parent et Bastin, 1981), dans le site HindIII de pMT3, pour donner le plasmide pMST10 (Figure 2). La molécule défective consiste en une copie répétée en tandem de la partie 5' de la région précoce, capable d'encoder 2 copies complètes de l'antigène petit T et des portions des antigènes T moyen et grand T. Cette molécule a été choisie parce qu'elle est incapable de transformer des cellules in vitro (Parent et Bastin, 1981) ou d'induire des tumeurs chez les rats (Tableau 2), et parce qu'elle contient un signal de polyadénylation du gène plt à 25.7 m.u. (Soeda et al., 1980) qui peut être important pour l'expression des gènes viraux.

Les résultats du Tableau 2 montrent que pMLT9 et pMST10 sont tumorigènes. Le fait que pMLT9 donne 4 tumeurs sur 12 animaux injectés peut laisser supposer qu'il y a complémentarité entre les antigènes T moyen et grand T dans la tumorigénèse. Cependant, quand les cellules tumorales ont été analysées pour la présence des antigènes T, nous nous sommes aperçus qu'une des lignées cellulaires tumorales MLT9 (MLT9t1) produisait du petit T (Figure 6). Etant donné que pMLT9 n'encode que les gènes pmt et plt, la seule explication pour la présence de petit T dans la lignée tumorale est que celui-ci est le résultat d'une recombinaison homologue entre les gènes pmt et plt du plasmide, pour reconstituer le génome de type sauvage. Suite à ce résultat, nous avons injecté le recombinant pMLT1 qui encode aussi les antigènes plt et pmt et qui ne peut pas reconstituer de gène petit T par recombinaison. Des injections

TABLEAU 2. Pouvoir transformant et tumorigène d'ADNs recombinants du virus du polyome.

Plasmide ^a	Transformation		Tumorigénicité	
	in vitro (Foyers/pétri) ^b		(nb tumeurs/nb rats inoculés) ^c	
pPA8	30,38,12 13,15,20	(100%)	24/56	(42.8%)
pMT3	5,6,3,4 2,3,5	(18%)	0/58	(0%)
pMST10	3,4,6,3 4,5,2	(18%)	7/13	(53.8%)
pMLT9	20,13,20 19,12	(78%)	4/12	(33.3%)
bc1051	-		7/20	(35.0%)
pHdf55	0,0,0,0	(0%)	0/23	(0%)
Control	0,0,0,0 0,0,0,0	(0%)	0/10	(0%)

^apPA8 est un plasmide qui contient le plus grand des deux fragments HindIII (44.6-1.8 m.u.) de l'ADN de A2 cloné dans pBR322. Il contient la région encodant les antigènes petit T et T moyen ainsi que la portion N-terminale de l'antigène grand T. pMT3 est un plasmide dérivé de pPyMT1 (Figure 2) qui encode seulement l'antigène T moyen. pMST10 est un plasmide hybride contenant le gène T moyen lié à la région encodant 25% de la région N-terminale de l'antigène grand T et l'antigène petit T (Figure 2). bc1051 porte un génome modifié de polyome incapable d'exprimer l'antigène grand T (Nilsson et Magnusson, 1983). pMLT9 contient le gène T moyen lié au génome du mutant hr-t NG-18 (Figure 2).

^bUne concentration d'ADN non-saturante équivalente à 0.2 µg de la région encodant l'antigène T moyen a été utilisée.

^cDes rats Fischer âgés d'un jour ont été inoculés de façon sous-cutanée dans le cou avec 2 µg d'ADN (dans 50 µl de PBS). pPA8 a été digéré avec HindIII et BamHI. pMT3 et bc1051 ont été digérés par HindIII, pMST10 par SalI et pMLT9 par ClaI. pBR322 a été utilisé comme contrôle.

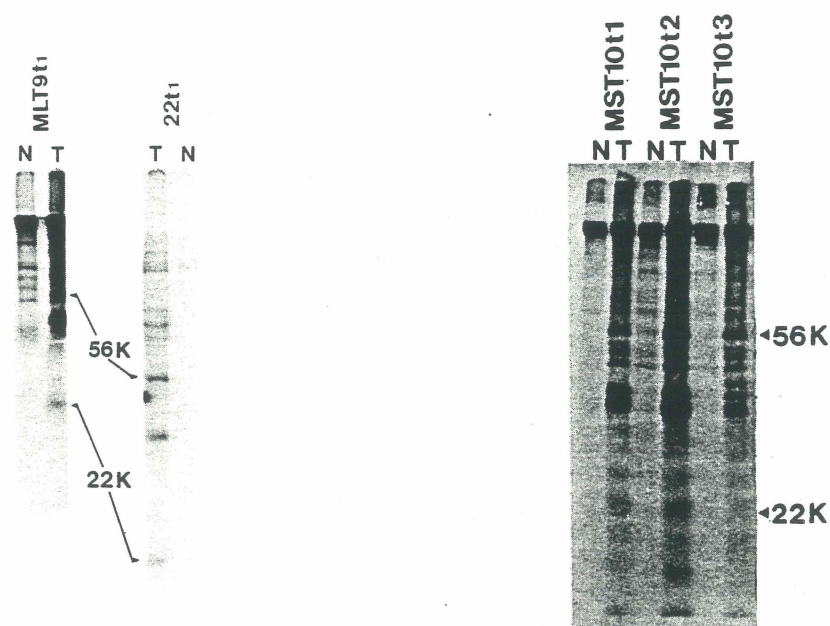


FIG. 6. Protéines virales synthétisées par les lignées cellulaires tumorales MLT9 et MST10. Les lignées cellulaires désignées MST10t1, MST10t2, et MST10t3 proviennent de tumeurs indépendantes. Les lignées MLT9t1 et 22t1 ont été induites respectivement, par l'ADN de pMLT9 et l'ADN cloné de A2. Les cellules ont été marquées à la [35 S]-méthionine (0.3 mCi par boîte) pendant 4 heures à 37°C. Les protéines ont été extraites, précipitées avec un sérum anti-T de polyome et séparées sur gel de polyacrylamide-SDS 10%. Les flèches indiquent les positions des antigènes T moyen (56K) et petit T (22K). N, sérum non-immun; T, sérum immun. L'identification de la protéine de 56K dans les lignées transformées a été établie en marquant la protéine T moyen in vivo au [32 P] et en la cartographiant par "peptide mapping" (Gélinas et Bastin, Virology, in press).

répétées de ce recombinaut hybride dans des rats nouveau-nés n'ont pas induit la formation de tumeurs (0/39). Cela suggère donc que le gène *plt* de polyome ne peut pas compléter le gène T moyen *in vivo*.

Rassoulzadegan et al. (1982) ont rapporté que le défaut de croissance à faible concentration de sérum de lignées FR3T3 n'exprimant que l'antigène T moyen pouvait être complété par la totalité de la protéine grand T ou par sa région N-terminale (40%). De la même façon, le cotransfert d'ADN encodant la protéine grand T ou sa région N-terminale complète le gène *pmt* dans la transformation de cellules FR3T3 dans un milieu à faible concentration de sérum. Les transformants obtenus étaient indépendants de facteurs de croissance exogènes pour l'expression du phénotype transformé. Pour vérifier si de telles propriétés pouvaient être acquises par des cellules transformées avec les recombinauts *pMLT9* et *pMST10*, nous avons examiné les caractéristiques de croissance de certains transformants à haute ou faible concentration de sérum. La transformation avec l'ADN de type sauvage *pPA8* (Figure 2) permet aux cellules d'atteindre une haute densité de saturation à 10% et 0.5% de sérum (*pPA8-17*, Figure 4). Les colonies transformées avec les plasmides *pMLT9* et *pMST10* ont été choisies au hasard et leurs caractéristiques de croissance analysées. Les cellules transformées par les gènes *pmt* et *plt* (cellules *MLT9*) n'ont pas nécessairement acquis la propriété de croissance à faible concentration de sérum (Figure 4). L'une des 3 lignées *MST10* analysées, *MST10-1*, a montré une assez bonne croissance dans 0.5% de sérum mais pas les 2 autres lignées, *MST10-2* et *MST10-3*. Cependant, toutes les lignées cellulaires *MLT9* et *MST10* étaient plus tumorigènes que les lignées

transformées seulement avec le gène T moyen (Figure 5, Tableau 1). Les tumeurs sont apparues plus rapidement, presque'en même temps que celles obtenues avec les cellules transformées par pPA8 (Figure 5).

Nous avons aussi transformé des cellules FR3T3 avec pMLT1 et nous avons vérifié la présence de l'antigène grand T par immunofluorescence dans 3 lignées cellulaires MLT1. Seulement une de ces lignées (MLT1-3) montre une fluorescence nucléaire intense (Figure 7). Ceci indique que les cellules expriment l'antigène grand T très efficacement. Au contraire des 2 autres lignées (MLT1-1 et MLT1-2), les cellules MLT1-3 atteignent une haute densité de saturation à 0.5% de sérum et sont très tumorigènes une fois transplantées dans des rats Fischer (Tableau 3). Ces résultats suggèrent que la dépendance de croissance à faible concentration de sérum et la tumorigénèse peuvent être complémentées par l'expression de l'antigène grand T même si celui-ci ne peut compléter le gène pmt dans la tumorigénèse in vivo.

II. Complémentation par l'antigène petit T.

La structure de pMST10 prédit que les tumeurs induites par ce recombinant peuvent produire l'antigène petit T. Pour vérifier si la complémentation peut vraiment être exercée par le petit T, nous avons évalué les propriétés tumorigéniques du mutant bc1051. A cause d'un changement de base (G → A) au nucléotide 410, qui empêche l'épissage de l'ARNm de l'antigène grand T, ce mutant n'exprime pas l'antigène grand T mais produit les antigènes T moyen et petit T (Magnusson et Nilsson, 1983). Nous avons été surpris de constater que l'injection du mutant

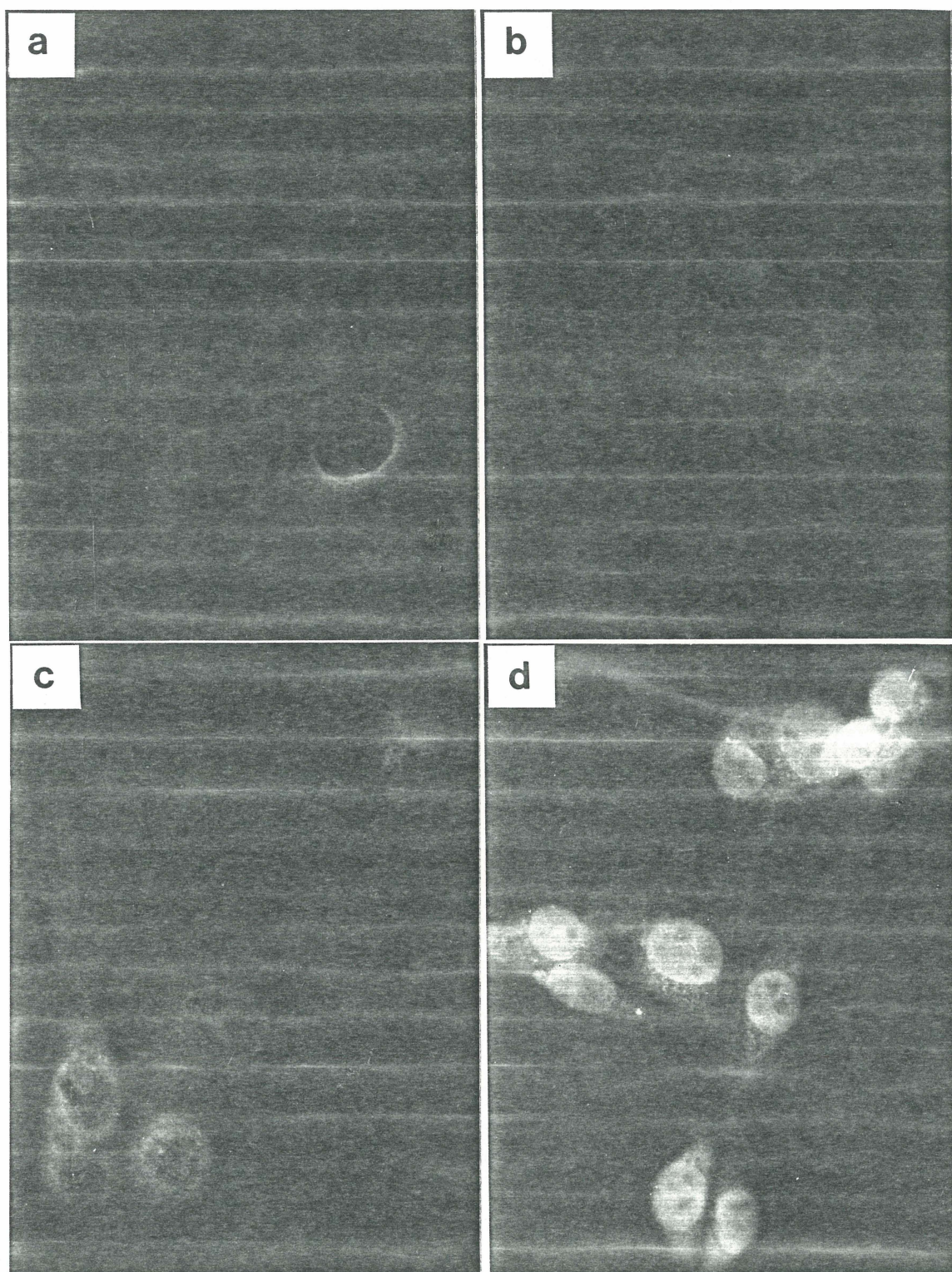


FIG. 7. Détection de l'antigène grand T de polyome par immunofluorescence. (a) MT3-9. (b) MLT1-1a. (c) MLT1-2. (d) MLT1-3. Grossissement: 400 X

TABLEAU 3. Propriétés des lignées cellulaires transformées.

Plasmide	Lignée cellulaire ^a	Vitesse de croissance (h)		Densité de saturation (cellules $\times 10^{-3}/\text{cm}^2$)		Nb tumeurs				
		10% sérum	0.5% sérum	10% sérum	0.5% sérum	Rats Fischer		Souris nues		
						5x10 ⁴	10 ⁴	5x10 ⁴	2x10 ⁴	10 ⁴
pMT	MT3-4	15.1	60.5	315	25	0/5	0/17	6/21	2/8	
	MT3-8	19.8	NG ^c	458	NG	0/7	0/6	0/17		
	MT3-10					5/6	2/6			5/8
	MT3-101	17.5	72.0	295	20	2/7		4/4		
	MT3-100					0/6				
pPA8	PA8-2						4/18		10/10	13/27
	PA8-3					6/10	7/24		8/8	5/6
	PA8-17	17.4	20.7	448	280					
	PA8-18	24.0	30.7	315	183				5/5	
pMLT1	MLT1-1	22.8	NG	214	NG	3/6				
	MLT1-2	18.7	43.5	229	56	1/6				
	MLT1-3	19.2	30.9	341	244	8/8				
pMLT9	MLT9-1	18.7	98.4	224	13	3/6		7/7		
	MLT9-3	17.0	67.7	315	25	4/5		5/5		
pMST1	MST1-1	19.2	NG	433	NB	5/5	6/6	8/8		3/4
	MST1-2	12.6	41.4	407	239	5/5	4/5	8/8		4/4
	MST1-3	22.2	84.0	203	7	4/5	5/6	8/8		3/4
bc1051	1051-1					6/6				
	1051-2	15.2	36.0	356	61	6/6				
	1051-3	17.4	38.4	275	51	6/6				
pMSV2	MSV2-1	24.4	39.6	356	26	6/6				
	MSV2-2	18.0	23.0	388	112	5/6				
pMSV1-a	MSV1-a1	16.6	33.6	611	127	6/6		7/8		
	MSV1-a2	15.3	32.4	356	137	4/6		10/10		
	MSV1-a3					11/12		8/8		
pMSV2-a	MSV2-a1	21.6	73.8	280	6.1	6/6				
	MSV2-a2	21.6	56.0	265	27.5	6/6				

^a Les cellules de la série MT3 ont été transformées par pMT3, le clone T moyen. Les cellules de la série pPA8 ont été transformées par pPA8, le plasmide portant le génome de type sauvage du virus du polyome. pMLT1 contient le gène T moyen lié au gène grand T de polyome. pMLT9 contient le gène T moyen lié à l'ADN de NG-18. pMST1 contient le gène T moyen lié au gène petit T de polyome. bc1051 est un génome modifié encodant les antigènes petit T et T moyen. pMSV2 contient le gène T moyen lié à l'ADN de $\Delta 2005$. pMSV1-a contient le gène T moyen lié à la région proximale de l'ADN de SV40. pMSV2-a contient le gène T moyen lié à la région proximale de l'ADN de $\Delta 2005$.

^b Les jeunes rats Fischer adultes et les souris nues ont été injectés de façon sous-cutanée dans les flancs avec le nombre indiqué de cellules transformées resuspendues dans 0.1 ml de PBS.

^c NG, pas de croissance.

bc1051 à des rats nouveau-nés produisait des tumeurs avec une efficacité comparable à celle de l'ADN de type sauvage (Tableau 2, Figure 3). Nous avons vérifié la présence des antigènes T moyen et petit T dans les lignées tumorales induites par pMST10 et bc1051. Les tumeurs, de près de 2 cm de diamètre, ont été extraites et les lignées cellulaires MST10t1 à MST10t4 et bc1051t1 à bc1051t3 ont été établies et clonées. Nous avons marqué les cellules à la [35 S]-méthionine et les protéines précipitées par le sérum anti-T de polyome ont été séparées sur des gels de polyacrylamide-SDS. La figure 6 montre que les trois lignées tumorales MST10t1, t2 et t3 expriment les antigènes petit T et T moyen de polyome. L'une des lignées, MST10t3, produit aussi un polypeptide supplémentaire qui pourrait être une forme tronquée des antigènes T moyen ou grand T. De plus, toutes les tumeurs induites par l'ADN de bc1051 expriment les protéines petit T (22K) et T moyen (56K) (Figure 8). Ces résultats démontrent que l'antigène petit T du virus du polyome peut compléter le gène pmt dans la tumorigénèse in vivo.

Nous avons signalé plus haut que les cellules transformées avec le gène pmt avaient un phénotype variable, allant d'un état normal à un état très transformé. Par ailleurs, nous avons noté une corrélation entre la capacité des cellules à croître à faible concentration de sérum et celle d'induire des tumeurs dans les souris nues et les rats Fischer (Asselin et al., 1983). Nous avons aussi observé que les lignées cellulaires capables de croître à faible concentration de sérum étaient toujours très tumorigènes. Toutefois, l'inverse n'est pas vrai. Nous avons analysé le phénotype de cellules transformées avec pMST1, un recombinant encodant le gène petit T et le gène T moyen (Figure 9). Les

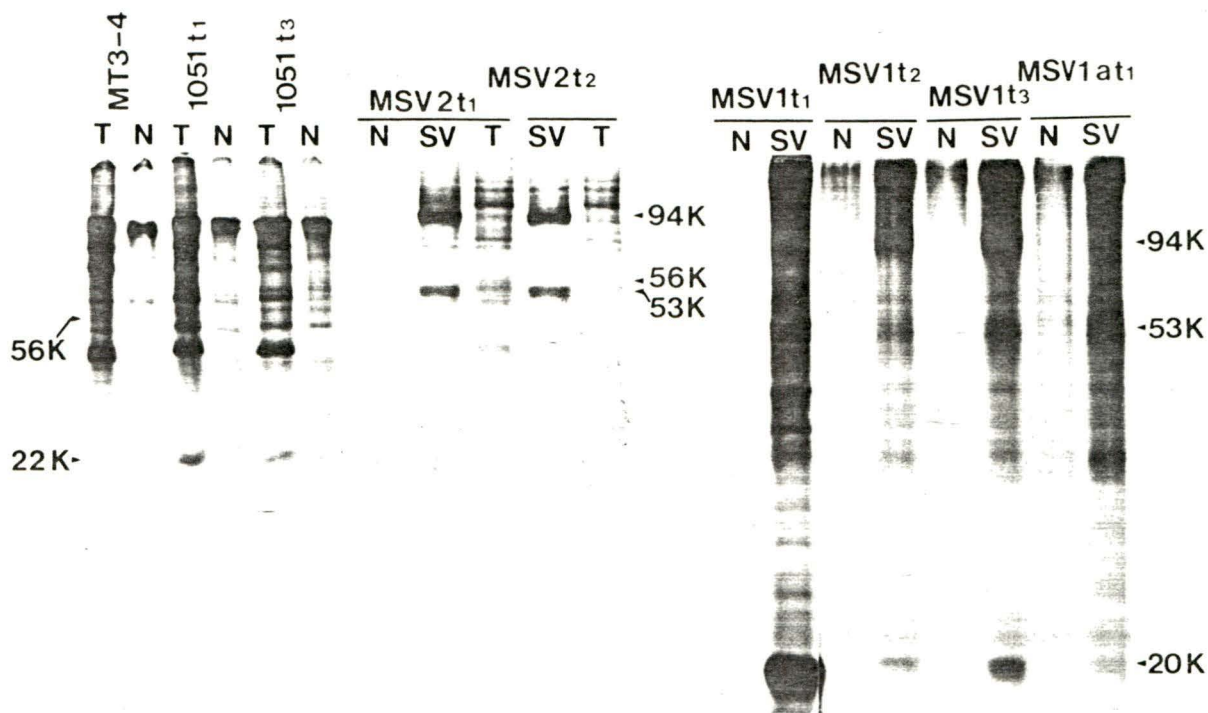


FIG. 8. Protéines virales synthétisées par des lignées cellulaires tumorales représentatives. MT3-4 est dérivé de cellules FR3T3 transfectées avec pMT3 (T moyen seulement). 1051t1 et 1051t2 sont des lignées cellulaires tumorales induites par injection de l'ADN de bc1051 (T moyen et petit T) dans des rats nouveau-nés. Les flèches indiquent les positions des antigènes T moyen (56 K) et petit T (22 K) de polyome. MSV2t1 et MSV2t2 sont des lignées cellulaires tumorales induites par pMSV2 (T moyen de polyome + grand T de SV40). MSV1t1, t2, et t3 sont des lignées cellulaires tumorales induites par l'ADN de pMSV1 (T moyen de polyome + antigènes petit T et grand T de SV40). La lignée MSV1at1 a été induite par pMSV1-a (T moyen de polyome avec la moitié de la région précoce de SV40). Les flèches indiquent la position de l'antigène grand T de SV40 (94K), l'antigène tumoral p53 (53K), l'antigène T moyen de polyome (56K) et l'antigène petit T de SV40 (20K). Les cellules ont été marquées à la [35 S]-méthionine (0.3 mCi par boîte) pendant 4 heures à 37°C. Les protéines ont été extraites, précipitées avec le sérum anti-T de SV40 ou de polyome et séparées sur gel de polyacrylamide-SDS 12.5%. N, sérum non-immun; SV, sérum anti-T de SV40; T, sérum anti-T de polyome.

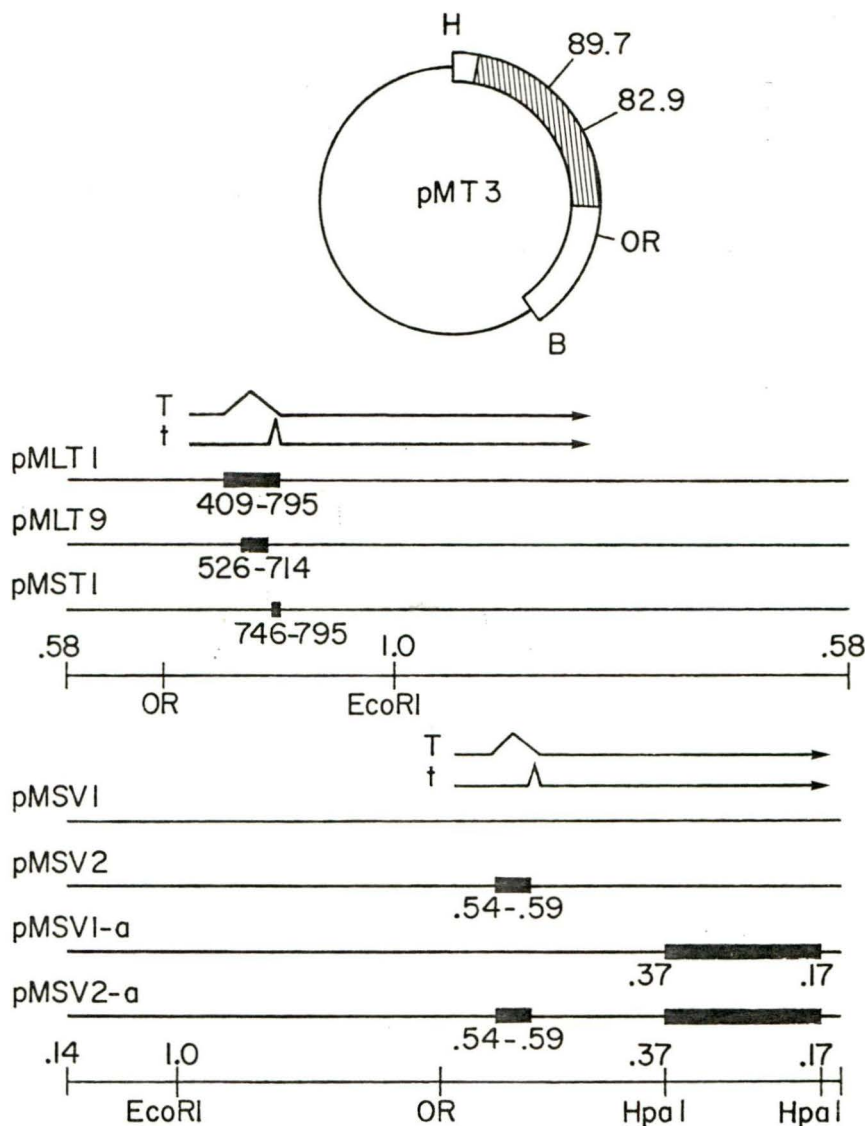


FIG. 9. Diagramme des séquences de polyome et SV40 liées au gène T moyen de polyome. Chaque génome a été digéré avec BamHI et inséré dans le site BamHI unique de pMT3. Les régions hachurées dans pMT3 représentent la région encodant l'antigène T moyen de polyome. Les ARNm des antigènes petit T et grand T de polyome et de SV40 sont indiqués. Les lignes déviées vers le haut représentent les introns et les flèches montrent les extrémités 3' des ARNm. Les plasmides ont été construits à l'aide des génomes suivants: pMLT9, mutant hr-t NG-18 (Benjamin et al., 1979); pMLT1, pPyLT1 (Treisman et al., 1981a); pMST1, pPyST1 (Treisman et al., 1981a); pMSV1, souche 777 de SV40; pMSV2, mutant de délétion de SV40, Δ 2005 (Sleigh et al., 1978); pMSV1-a, délétion dans la région encodant l'antigène grand T de SV40 entre les nucléotides 3733 et 2666; pMSV2-a, même délétion dans Δ 2005. Les délétions sont indiquées par des régions foncées. Les cartes de restriction de polyome et de SV40 sont linéarisées au site BamHI. Abréviations: H, HindIII; B, BamHI; OR, origine.

cellules de la série MST1 sont très tumorigènes une fois transplantées dans des souris nues ou des rats Fischer, mais elles n'acquièrent pas nécessairement la propriété de croissance à faible concentration de sérum (Tableau 3). Nous avons aussi analysé les propriétés de cellules FR3T3 transformées par le recombinant bc1051. Comme les cellules MST1, les cellules bc1051 sont très tumorigènes même si elles ne croissent pas à faible concentration de sérum (Tableau 3). Donc, le gène petit T peut aussi restaurer le faible pouvoir tumorigène de cellules transformées par le gène pmt in vitro.

III. Complémentation par les antigènes précoces de SV40 et Ad2 et par l'oncogène cellulaire myc.

Il était intéressant de déterminer si la co-injection de gènes précoces provenant d'autres virus oncogènes à ADN pouvait compléter le gène pmt dans la tumorigénèse. Nous avons construit différents plasmides recombinants capables d'encoder indépendamment l'antigène T moyen et l'un ou les 2 antigènes T de SV40. Les séquences encodant l'antigène grand T de SV40 ont été fournies par le mutant de délétion $\Delta 2005$ (Sleigh et al., 1978). L'ADN de $\Delta 2005$ et celui de SV40 (souche 777) ont été digérés avec BamHI et clonés dans le site BamHI de pMT3 (pMSV2 et pMSV1; Figure 9). Nous avons aussi introduit une délétion dans le génome de SV40 (pMSV1-a) en enlevant un fragment HpaI de 1067 pb (3733 à 2666) (Figure 9). Cette délétion s'étend au-delà du codon de terminaison du gène grand T et aucun signal de terminaison ne survient avant le site de polyadénylation à l'extrémité 3' de l'ARNm précoce.

Nous avons produit cette délétion dans le génome de $\Delta 2005$ de la même façon (pMSV2-a), ou en insérant un adaptateur XhoI au site HpaI (3733) (pMSV2-b).

L'injection de l'ADN de pMSV1, portant le gène T moyen de polyome lié au génome de SV40, induit des tumeurs chez les rats après la même période de temps et aussi efficacement que l'injection de l'ADN de type sauvage de polyome (pPA8) ou de bc1051 (Figure 3; Tableau 4). Ni le gène pmt, ni l'ADN de SV40 ne peuvent induire de tumeurs chez le rat s'ils sont inoculés séparément. Le plasmide pMSV2, qui encode les protéines T moyen de polyome et grand T de SV40, s'est révélé actif, avec une efficacité plus faible et un temps de latence plus long (Figure 3; Tableau 4). La moitié de la région précoce de SV40 (pMSV1-a) et de $\Delta 2005$ (pMSV2-b) permet de compléter le gène pmt dans la tumorigénèse mais avec une faible efficacité (1/20 et 1/19 respectivement, Tableau 4). pMSV2-a, un plasmide analogue à pMSV2-b, s'est révélé négatif dans l'essai de tumorigénèse (Tableau 4). Nous avons aussi mis en évidence, par immunoprécipitation, la protéine T moyen de 56K dans les tumeurs induites avec le recombinant pMSV2 (Figure 8). De plus, l'antigène grand T de SV40 et l'antigène tumoral de 53K, p53, sont présents dans les cellules tumorales induites avec pMSV2 et pMSV1. L'analyse des protéines induites avec pMSV1 (T moyen de polyome et SV40) et pMSV1-a (T moyen de polyome et portion N-terminale de la région précoce de SV40) a aussi montré la présence de l'antigène petit T de 20KD. Dans le cas de la lignée tumorale MSVlat1, la protéine grand T de 94K n'est pas produite mais on retrouve la protéine p53. Donc, l'antigène grand T de SV40, ou sa région N-terminale, peut compléter l'antigène T moyen dans la tumorigénèse et l'antigène petit T de SV40 a un effet stimulateur.

TABLEAU 4. Activité tumorigène des plasmides recombinants.

Plasmide	Capacité codante (gènes précoces)	Nb tumeurs/Nb de rats inoculés ^a
pMT3	Py middle T	0/58
pMSV1	Py middle T + SV40 large T & small T	8/17
pMSV2	Py middle T + SV40 large T	3/19
pMSV1-a	Py middle T + SV40 small T & N-terminal 311 amino acids of large T	1/20
pMSV2-a	Py middle T + N-terminal 311 amino acids of SV40 large T	0/20
pMSV2-b ^b	Py middle T + N-terminal 311 amino acids of SV40 large T	1/19
pMAd2	Py middle T + Ad2 E1A + E1B	2/33
pMAd5	Py middle T + Ad5 E1A + E1B	1/16
pME1A	Py middle T + Ad2 E1A	2/23

^aDes rats Fischer âgés de un jour ont été inoculés de façon sous-cutanée dans le cou avec 2 µg d'ADN linéarisé (dans 50 µl de PBS). pMT3 a été digéré par HindIII. Les plasmides de la série pMSV ont été digérés avec ClaI ou SalI. Les plasmides de la série pMAd ont été digérés par EcoRI. Les tumeurs ont été comptées jusqu'à 5 mois après l'inoculation.

^bPlasmide dérivé de pMSV2 par insertion d'un adaptateur XhoI de 8 pb dans le site HpaI (3733).

Nous avons aussi transformé des cellules FR3T3 avec différents recombinants et évalué la tumorigénicité des lignées cellulaires transformées. Les cellules transformées par le gène pmt lié à la totalité ou à la portion 5' de la région précoce de SV40 sont très tumorigènes chez le rat Fischer et la souris nue (Tableau 3). La complémentation ne dépend pas nécessairement du petit T puisque pMSV2 et pMSV2-a, qui ne peuvent pas produire cet antigène, donnent des lignées très tumorigènes. Les 3 lignées cellulaires MSV2 produisent l'antigène grand T de SV40 de 94K, antigène qui est absent dans les 3 lignées MSV2-a (Figure 10). Aucun antigène tronqué n'est visible dans celles-ci. Toutefois, l'antigène tumoral p53 est présent dans toutes les lignées. Certains laboratoires ont observé une corrélation entre un haut niveau de p53 et l'indépendance d'ancrage (Lane et Crawford, 1979), ce qui est en accord avec le phénotype tumorigène des lignées cellulaires.

Nous avons aussi cloné dans le site BamHI de pMT3 un plasmide encodant la région E1A complète et une partie de la région E1B d'Ad2 (9.1% du génome, jusqu'au site BglIII) insérées dans le site PstI de pBR322. Nous avons observé un effet de complémentation avec les régions E1A et E1B de l'ADN d'Ad2, mais avec une faible efficacité de formation de tumeurs (une tumeur sur 15 à 20 animaux injectés) (Figure 3; Tableau 4). La même efficacité a été obtenue par complémentation du gène pmt avec les régions E1A et E1B de l'ADN d'Ad5. De plus, nous n'avons observé aucune différence quand le gène pmt et la région E1A et E1B d'Ad2 étaient co-injectés séparément ou liés sous la forme d'un plasmide hybride. Pour déterminer si la région E1A et E1B complète était nécessaire pour compléter le T moyen de polyome, nous avons délété la

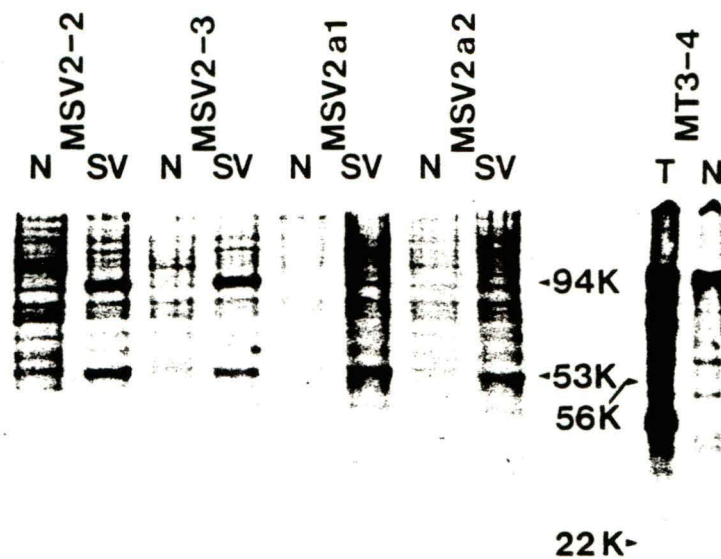


FIG. 10. Protéines virales synthétisées dans les cellules transformées avec pMSV2 et pMSV2-a. MSV2-2 et MSV2-3 ont été dérivés de cellules FR3T3 transfectées avec pMSV2 (T moyen de polyome lié à l'ADN de $\Delta 2005$). MSV2a1 et MSV2a2 ont été obtenus par transfection de cellules FR3T3 avec pMSV2-a (T moyen de polyome lié à la région N-terminale de l'ADN de $\Delta 2005$). Les flèches indiquent les positions de l'antigène grand T de SV40 (94K) et de l'antigène tumoral p53 (53K). N, sérum non-immun; SV, sérum anti-T de SV40. Les cellules ont été marquées à la [35 S]-méthionine (0.3 mCi par boîte) pendant 4 heures à 37°C, extraites et précipitées avec un sérum anti-T de SV40, et séparées sur un gel de polyacrylamide-SDS 12.5%.

séquence codant la région E1B de pMad2 par digestion partielle avec PstI (Figure 11). Le recombinant obtenu, pME1A, s'est montré aussi tumorigène chez le rat que pMad2 (Tableau 4). Philip Branton (McMaster University) a analysé par immunoprécipitation les protéines produites dans les tumeurs induites par l'ADN de pMad2. Dans les cellules MAd, seuls les produits de 52K et 50K de la région E1A ont été décelés (Asselin et al., 1984). Habituellement, ce sont les produits majeurs rencontrés dans les cellules transformées par l'adénovirus (Rowe et al., 1984). Donc, le protéine T moyen peut être complémentée dans la tumorigénèse par des produits de la région E1A d'Ad2.

Nous avons voulu déterminer si le gène c-myc pouvait compléter le gène pmt dans notre essai de tumorigénèse. Land et al. (1983) ont montré que la complémentation entre c-myc et pmt pouvait s'exercer in vitro. Nous avons inséré dans les sites BamHI et EcoRI de pSVc-myc-1 (Land et al., 1983), le fragment BamHI-EcoRI de pMT3. Nous avons digéré le plasmide avec EcoRI et l'avons injecté à des rats nouveau-nés. 4 tumeurs sur 40 animaux injectés (10%) sont apparues. Toutefois, les tumeurs étaient très liquides et très différentes de tumeurs induites par l'ADN du virus du polyome. Donc, le gène c-myc peut compléter le gène pmt in vivo.

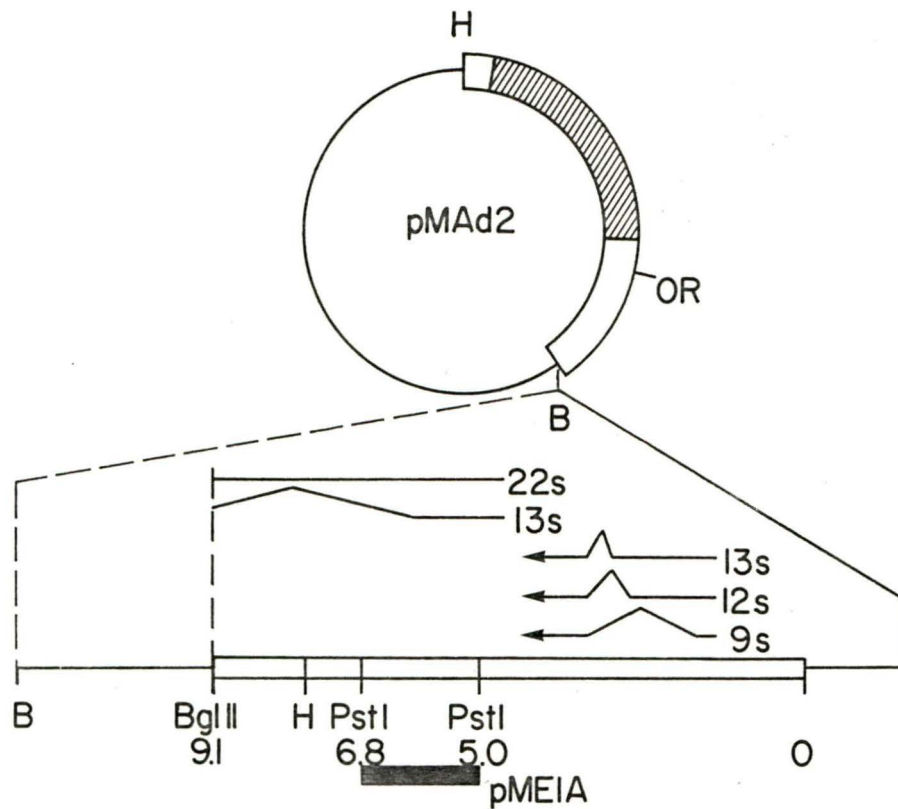


FIG. 11. Structure des plasmides recombinants pMAd. La région E1A + E1B de Ad2 (0 à 9.1% du génome) a été insérée dans le site PstI de pBR322. Le plasmide a été digéré avec BamHI et inséré dans le site BamHI de pMT3. La région hachurée représente la séquence encodant l'antigène T moyen. La ligne simple représente les séquences de pBR322 ou pAT153. Les séquences de l'ADN d'Ad2 sont indiquées par la double ligne. Les ARNm de E1A et E1B sont indiqués. La région foncée montre la délétion dans pME1A obtenue par digestion partielle avec PstI. Abréviations: H, HindIII; B, BamHI; OR, origine.

Deuxième partie

Immortalisation de cellules primaires de rat par des mutants de délétion des gènes grand T de polyome et de SV40.

I. Détermination de la région minimale du gène grand T de polyome (plt) nécessaire à l'immortalisation.

Nous avons effectué la mutagénèse à la nucléase Bal31 dans le gène plt de 3 plasmides différents (pMLT1, pLT1 et pLT3). Nous avons analysé de nombreux recombinants avant de conserver certains mutants que nous allons décrire.

1. Description des mutants générés dans pMLT1.

Le gène plt de polyome ou les premiers 42% du gène jusqu'au site EcoRI (1559) immortalisent des cellules primaires de rat (Rassoulzadegan et al., 1983). Dans le but de déterminer les séquences minimales nécessaires à l'immortalisation, nous avons introduit des délétions à la nucléase Bal31 dans le gène plt, après avoir linéarisé le plasmide pMLT1 avec EcoRI (1559). Ce plasmide ne contient qu'un seul site EcoRI, suite à l'inactivation à la Klenow des sites EcoRI en 3' du gène T moyen (pmt). Le plasmide linéarisé a été traité avec 1 U de nucléase Bal31 pendant 15 à 120 secondes, dans des conditions qui délètent 180 pb/minute/extrémité bicaténaire (Maniatis et al., 1982).

plt-65: Le mutant de délétion plt-65 conserve les sites SstI (1373) et HindIII (1656). Un nouveau fragment HinfI de 490 pb remplace celui de

704 pb (1335 à 2039) (Figure 12). Donc, la délétion de plt-65 est d'environ 210 pb entre les sites SstI (1373) et HindIII (1656) (Figure 13).

plt-63: Les sites SstI (1373) et HindIII (1656) sont délétés dans le mutant plt-63. Un nouveau fragment de 325 pb, au lieu de 704 pb (1335 à 2039), apparaît suite à la digestion avec HinfI (Figure 12). Le site HinfI à 1269 est présent puisque le fragment de 309 pb (960 à 1269) est intact. Cependant, il est possible que la délétion inactive l'un ou les deux sites HinfI (1287 et 1335) puisque ces fragments ne sont pas visibles sur le gel. plt-63 a donc une délétion de près de 380 pb dont la limite en 5' du site EcoRI se situe entre SstI (1373) et HinfI (1269). En 3', la délétion va au-delà du site HindIII (1656) (Figure 13).

plt-9: Ce mutant de délétion conserve le site HindIII (1656) mais perd le site AvaI (1016). Les fragments HinfI de 189, 309, 18, 48 et 704 pb, entre les nucléotides 385 et 2039 sont délétés (Figure 12), avec inactivation des sites HinfI à 960, 1269, 1287 et 1335. Un nouveau fragment de 580 pb remplace un fragment totalisant 1268 pb. La délétion de plt-9 couvre près de 690 pb entre les sites HinfI (385) et HindIII (1656) (Figure 13).

2. Description des mutants générés dans pPyLT1.

plt-AvaI: Nous avons construit un mutant de délétion en inactivant le site AvaI (1016) à la Klenow. L'inactivation du site change le cadre de lecture en 3' et produit un gène tronqué à partir du site AvaI (1016) (Figure 13).

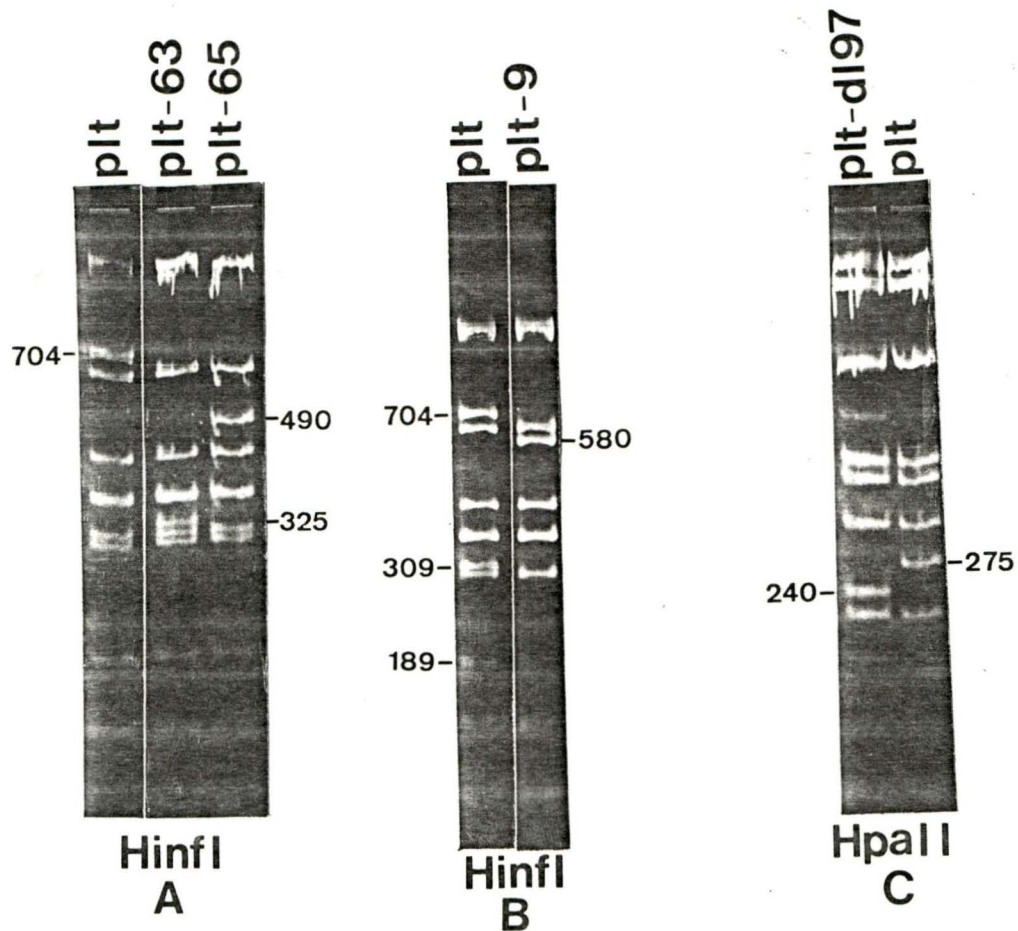


FIG. 12. Analyse de restriction des mutants de délétion de *plt*. (A) et (B) *plt-63*, *plt-65* et *plt-9* ont été obtenus par mutagenèse à la *Bal31* à partir du site *EcoRI* de *pMLT1*. Le fragment *BamHI* des mutants a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec *HpaII* et les fragments générés ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. *plt-63* et *plt-65* ont respectivement un fragment *HinfI* de 325 et 490 pb au lieu de 704 pb (1335-2039). *plt-9* perd les fragments *HinfI* de 704, 309 et 189 pb, entre les nt 385 et 2039, et a un nouveau fragment *HinfI* de 580 pb. (C) *plt-dl97* a été obtenu de *pPyLT1* par mutagenèse à la *Bal31* à partir du site *SstI*. Le fragment *BamHI* a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec *HpaII* et les fragments obtenus ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. *plt-dl97* a une délétion de 35 pb dans le fragment *HpaII* de 275 pb (1213-1488).

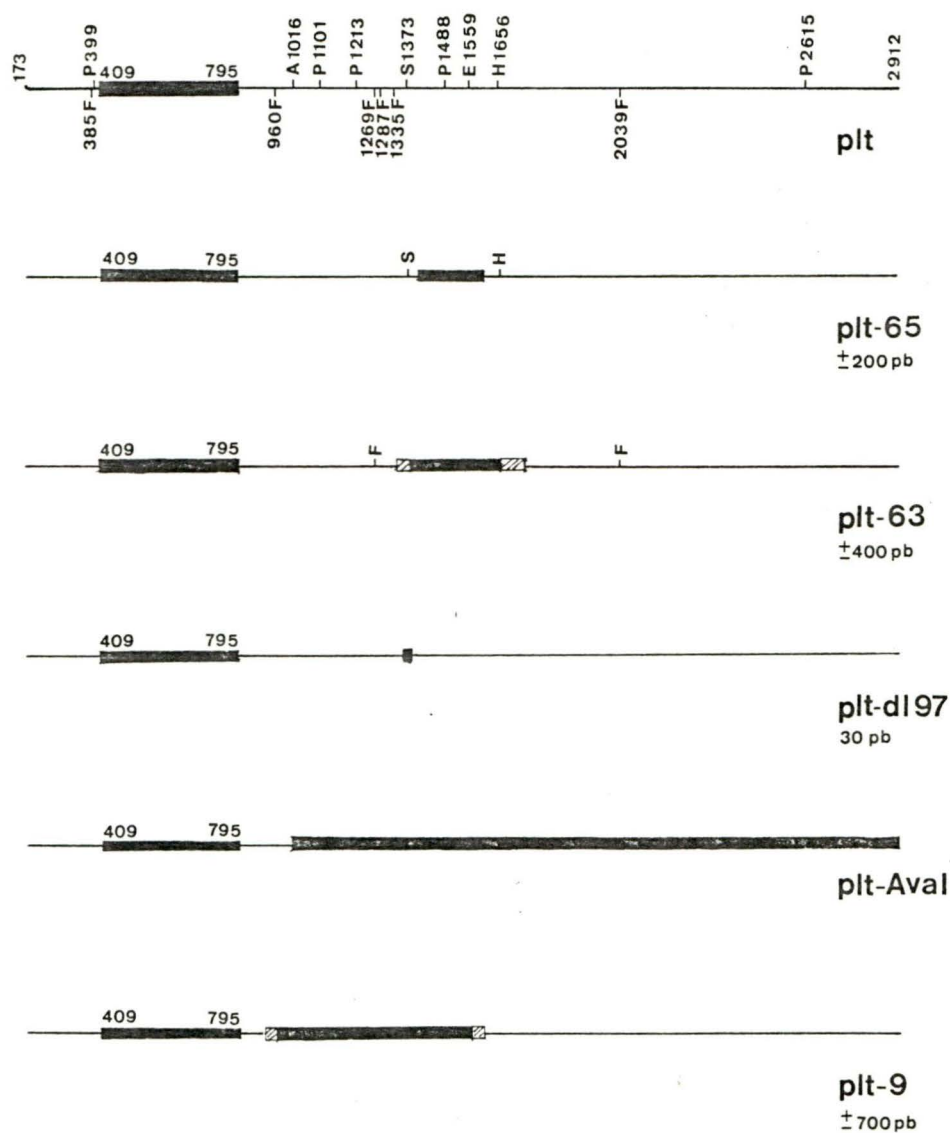


FIG. 13. Carte de restriction des mutants de délétion de *plt*. Les zones foncées et hachurées montrent l'étendue des délétions. La région entre les nucléotides 409 et 795 représente les séquences de l'intron qui sont délétées dans le gène *plt*. La grandeur approximative de la délétion, en paire de bases (pb), est aussi indiquée. Abréviations: A, AvaI; E, EcoRI; F, HinfI; H, HindIII; P, HpaII; S, SstI.

plt-dl97: Nous avons aussi construit un mutant du gène plt en digérant partiellement le plasmide pPyLT1 avec SstI et en introduisant une délétion au niveau du site SstI (1373) avec la nucléase Bal31. Les conditions utilisées (0.5 U de nucléase Bal31, pendant 15 à 60 secondes) ont permis de déléter 78 pb/minute/extrémité bicaténaire. La digestion avec HpaII montre une délétion de près de 35 pb dans le fragment HpaII de 275 pb (1213 à 1488) (Figure 12, 13).

3. Description des mutants générés dans pLT3 et pMT3.

pLT3 est un dérivé de pPyLT1. Il a été obtenu par délétion des deux fragments HindIII. Il a donc une structure analogue à pMT3 et contient la région du gène plt jusqu'au site HindIII (1656). pLT3 a été digéré avec SstI (1373) et traité à la nucléase Bal31 pendant 15 à 120 secondes, dans des conditions qui délètent 107 pb/minute/extrémité bicaténaire. Dans tous les mutants de délétion décrits, nous avons conservé le site HpaII (1488) afin d'éviter le plus possible de perdre le signal de polyadénylation secondaire (AATAAA) de 1476 à 1481, signal qui peut être important dans la stabilité de l'ARNm. Nous avons cherché à obtenir des mutations entre les sites AvaI (1016) et HpaII (1488). Mais, il a été difficile et même impossible d'obtenir, dans ces conditions, des délétions se terminant près du site AvaI (1016) à cause de la présence de nombreuses régions riches en G-C qui ralentissent la progression de la nucléase Bal31. Les fragments BamHI-EcoRI (4632-1559) ou BamHI-HindIII (4632-1656) ont été analysés avec HpaII, HinfI et AluI. Nous avons obtenu trois groupes de mutants.

plt3-18: Le premier groupe consiste en des mutants dont la délétion se situe entre HinfI (1269) et HpaII (1488). Par exemple, plt3-18 a un fragment HpaII de 145 pb au lieu de 275 pb (1213 à 1488) ce qui donne une délétion d'environ 130 pb (Figure 14).

Le fragment HinfI de 309 pb (960 à 1269) est intact (Figure 15). Mais la limite de la délétion en 5' du site SstI (1373) est indéterminée à cause de la présence de 3 sites HinfI rapprochés (1269, 1287 et 1335). Ces petits fragments ne sont pas visibles sur le gel. Donc plt3-18 a une délétion (dl) d'environ 130 pb entre HinfI (1269) et HpaII (1488) (Figure 16). Les mutants plt3-1 (dl d'environ 100 pb), plt3-50 (dl d'environ 90 pb) et plt3-78 (dl d'environ 140 pb) sont dans ce groupe (Figure 14, 15).

plt3-199: Le deuxième groupe comprend deux mutants, plt3-199 (dl d'environ 200 pb) et plt3-200 (dl d'environ 210 pb). En effet, plt3-199 a un fragment HpaII de 75 pb et plt3-200, de 65 pb, au lieu du fragment HpaII de 275 pb (1213 à 1488) (Figure 14). Les sites HinfI à 1269, 1286 et 1335 sont inactivés et les fragments HinfI de 309, 224, 48 et 18 pb (599 pb au total) sont remplacés par un fragment d'environ 380 ou 400 pb (Figure 15). La digestion avec AluI montre que le site AluI à 1232 est présent puisque le fragment AluI de 87 pb (1145 à 1232) est intact (Figure 15). Donc, plt3-199 et plt3-200 ont une délétion d'environ 200 pb entre AluI (1232) et HpaII (1488) (Figure 16).

plt3-221: plt3-221 perd deux fragments HpaII, celui de 275 pb (1213 à 1488) et de 112 pb (1101 à 1213). Un fragment HpaII de 150 pb les

remplace. Le site HpaII à 1213 est donc inactivé (Figure 14). La digestion avec HinfI montre deux nouveaux fragments de 250 et 120 pb (Figure 15). Cela veut dire qu'un site HinfI est régénéré au site de délétion. Ces deux fragments qui totalisent 370 pb remplacent la région située entre HinfI (960) et EcoRI (1559), soit 599 pb. La délétion est donc d'environ 230 pb. Suite à la digestion avec AluI, nous nous sommes aperçus que le site AluI à 1145 était présent puisque le fragment AluI de 212 pb (933-1145) est intact (Figure 15). Comme le fragment HinfI (960) à AluI (1145) fait 185 pb, cela laisse supposer que le site HinfI supplémentaire se situe entre HinfI (960) et un endroit situé près de 250 pb plus loin, vers les nucléotides 1200-1210. En 3' du site SstI (1373), la région entre EcoRI (1559) et HpaII (1488) est intacte. Comme le deuxième fragment HinfI mesure environ 120 pb, cela veut dire que la délétion se termine vers les nucléotides 1430-1440. Donc, la délétion de plt3-221 couvre près de 230 pb, conserve les site AluI (1145) et HpaII (1488) et aurait comme limite approximative les nucléotides 1200 et 1430 (Figure 16).

plt3/AvaI-SstI: Nous avons construit un autre mutant de délétion plt3/AvaI-SstI par digestion complète avec AvaI (1016) et SstI (1373) et traitement des extrémités cohésives à la Klenow (AvaI) et à la T4 ADN polymérase (SstI). Ce mutant a une délétion de 357 pb (Figure 16).

pmt-AvaI: Nous avons inactivé à la Klenow le site AvaI (1016) de pMT3. Cette inactivation change le cadre de lecture du gène pmt en celui du gène plt à partir de AvaI (1016). (Figure 16).

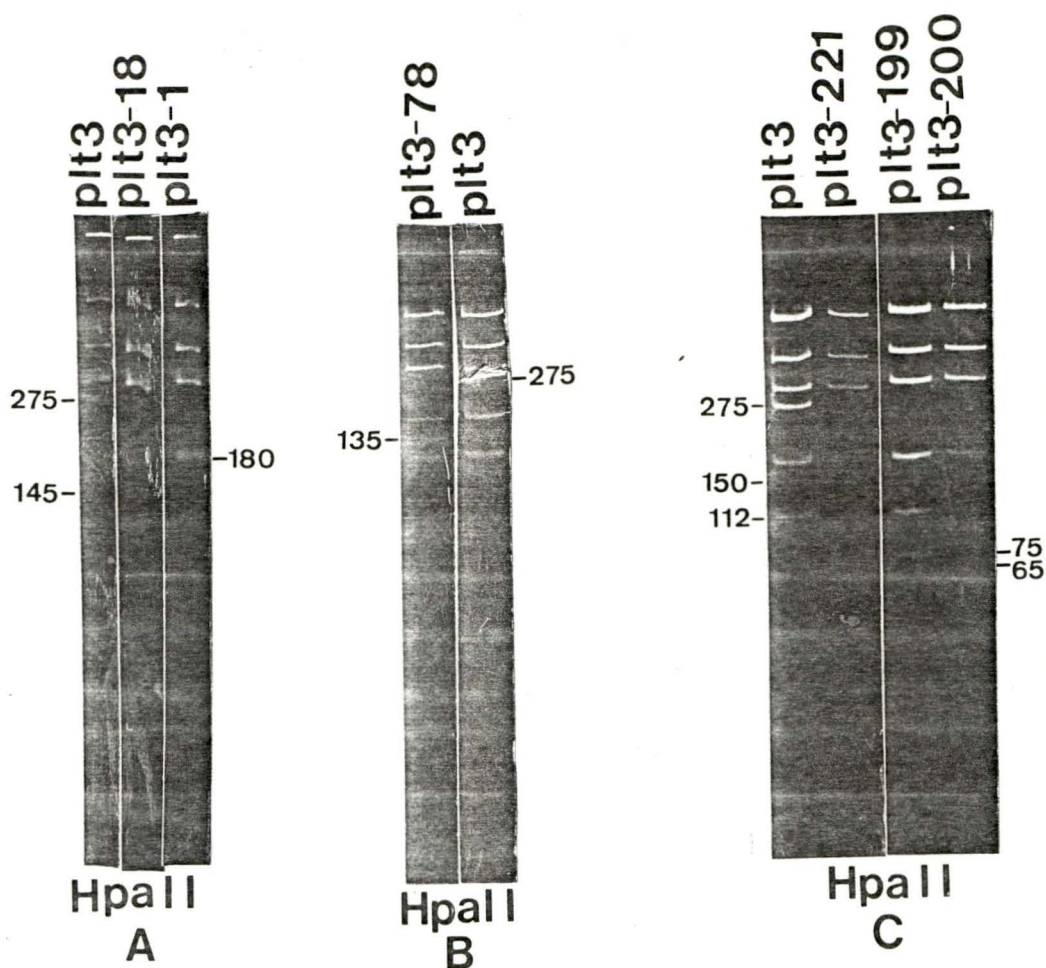


FIG. 14. Analyse de restriction des mutants de délétion de *plt3* avec *HpaII*. Les mutants de délétion de *plt3* ont été obtenus par mutagenèse à la *Bal31* à partir du site *SstI* de *PLT3*. Le fragment *BamHI-HindIII* a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec *HpaII* et les fragments ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. (A) et (B) Il y a une délétion dans le fragment *HpaII* de 275 pb (1213-1488) pour les 3 recombinants qui montrent un nouveau fragment de 180 pb (*plt3-1*), 145 pb (*plt3-18*) et 135 pb (*plt3-78*). (C) *plt3-199* et *plt3-200* ont un nouveau fragment de 75 pb et 65 pb respectivement, qui remplace celui de 275 pb. *plt3-221* perd en plus le fragment *HpaII* de 112 pb (1101-1213). Un nouveau fragment de 150 pb apparaît.

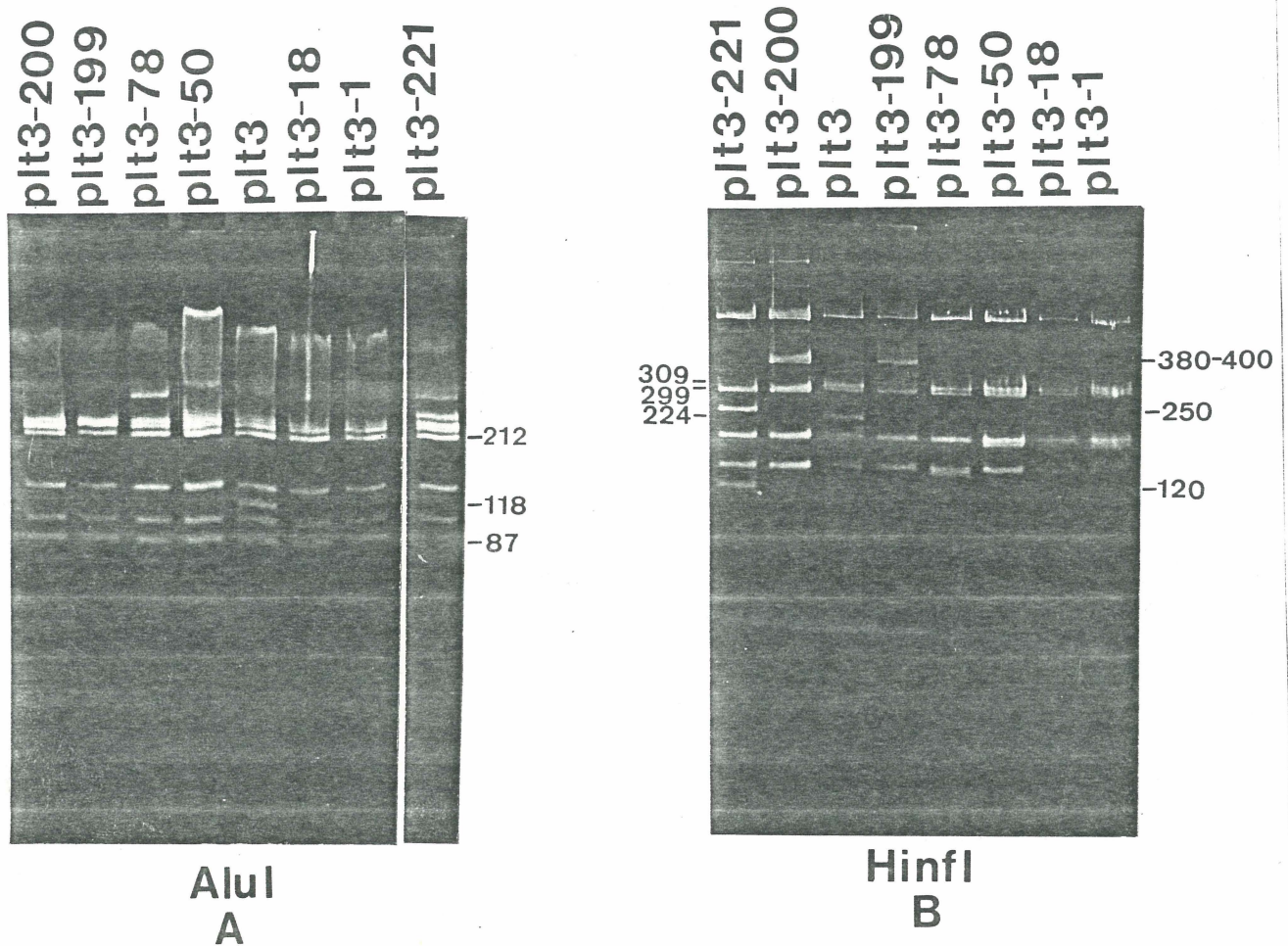


FIG. 15. Analyse de restriction des mutants de délétion de *plt3* avec *AluI* et *HinfI*. (A) Le fragment *Bam*HI-*Hind*III des mutants de délétion a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec *AluI* et les fragments générés ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. Tous les mutants de délétion ont conservé le fragment *AluI* de 212 pb (933-1145) et ont perdu le fragment de 118 pb (1232-1350). Seul *plt3*-221 perd le fragment *AluI* de 87 pb (1145-1232). (B) Le fragment *Bam*HI-*Eco*RI des mutants de délétion a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec *HinfI* et les fragments obtenus ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. Le fragment *HinfI*-*Eco*RI de 224 pb (1335-1559) est délété chez tous les mutants. *plt3*-1, 18, 50 et 78 conservent le fragment *HinfI* de 309 pb (960-1269). Ce fragment est délété dans *plt3*-199, 200 et 221: *plt3*-199 et 200 ont un nouveau fragment *HinfI* de 380-400 pb et *plt3*-221 en a 2, de 250 et 120 pb.

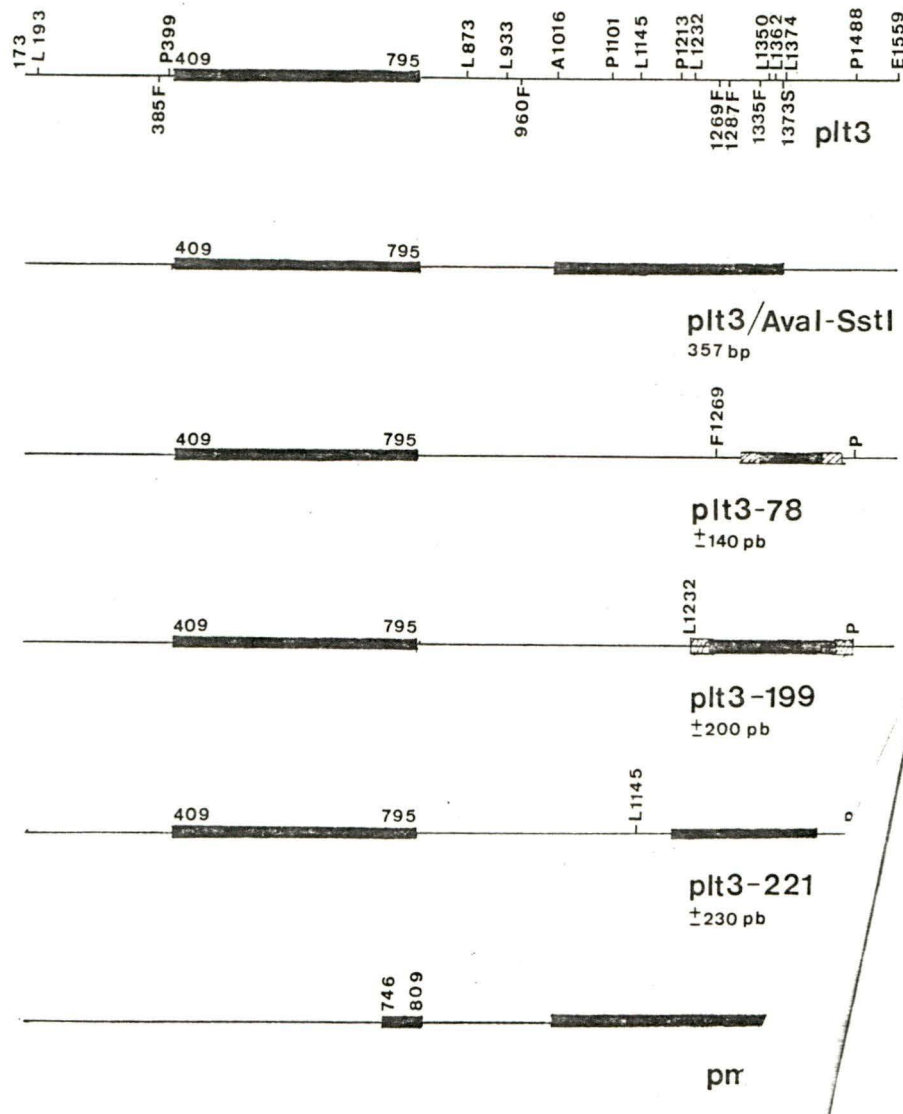


FIG. 16. Carte de restriction des mutants de délétion de *plt3* et *pmt*. Les zones foncées et hachurées montrent l'étendue des délétions. La région entre les nucléotides 409 et 795 représente les séquences de l'intron qui sont délétées dans *plt3*, et la région entre 746 et 809 représente les séquences de l'intron qui sont délétées dans le gène *pmt*. La grandeur approximative de la délétion, en paire de bases (pb), est aussi indiquée. Abréviations: A, AvaI; E, EcoRI; F, HinfI; L, AluI; P, HpaII; S, SstI

4. Immortalisation de cellules primaires de rat avec les mutants de délétion de plt.

i) Essai d'immortalisation.

Pour évaluer le potentiel immortalisant du gène plt et de certains mutants de délétion, nous avons développé une méthode de transfection et de sélection basée d'abord sur l'acquisition d'un gène codant pour une aminoglycoside phosphotransférase qui permet la survie de cellules dans un milieu contenant un agent sélectif, le G-418 (Southern et Berg, 1982). Nous avons utilisé des cellules primaires d'embryons de rat de 15 jours et effectué 6 à 9 transfections indépendantes sur trois lots de cellules provenant d'embryons différents. Nous avons fait la transfection selon la méthode de Wigler et al. (1978) avec 8 µg d'ADN contenant le gène plt lié au site BamHI de pSV2neo, dans une orientation tête-à-queue. Les cellules sont distribuées de façon à obtenir 20% de confluence après 24 heures de culture. Elles sont ensuite traitées à la généticine (G-418, 400 µg/ml). Le milieu est ensuite changé tous les cinq jours. Après 3 à 4 semaines, les clones résistants au G-418 sont recueillis et passés dans des puits de 15 mm de diamètre, à des dilutions 1:3 à 1:5, chaque fois que les cellules atteignent la confluence. Les cellules sont considérées comme immortalisées quand elles ont subi plus de cinq passages.

Les cellules transfectées sans le plasmide pSV2neo décollent après 5 à 7 jours de sélection. La sélection des cellules transfectées avec pSV2neo se fait sur une période plus longue et est presque complète

après 15 jours. Le plasmide pSV2neo confère donc une résistance transitoire au G-418 à une bonne proportion des cellules. La sélection se fait plus lentement et se termine plus tardivement. Une fois que les cellules résistantes au G-418 ont été isolées, il s'opère une deuxième sélection pour des clones qui ont une capacité de croissance accrue. De nombreuses zones de croissance obtenues avec pSV2neo seul décollent après 15 jours puisque les cellules primaires ont un potentiel de division limitée. Cette sélection est particulièrement favorisée par le changement de milieu tous les cinq jours. Cela implique aussi que la quantité de colonies résistantes dépend de l'avantage de croissance fourni par le gène cotransfecté avec pSV2neo. La figure 17 montre que le nombre de colonies par boîte varie selon le gène transfecté avec pSV2neo. Par exemple, pSV2neo seul donne entre 10 et 15 colonies résistantes par transfection, plt/neo en a de 40 à 50 et un mutant de plt, pltdl97/neo, qui s'est montré plus efficace dans l'essai d'immortalisation, en produit de 80 à 90. Il y aurait donc un lien entre le nombre de clones résistants qui supportent la sélection et l'efficacité d'immortalisation. Nous allons revenir sur ce dernier détail plus loin.

L'aspect des colonies est aussi affecté par l'ADN transfecté. La morphologie des colonies est plus variable et moins régulière avec pSV2neo qu'avec plt/neo et pltdl97/neo. Cette variation semble reliée à la capacité d'immortalisation du gène (voir plus loin). Pour que l'essai soit valable, nous nous sommes efforcés de choisir les colonies sans tenir compte de leur morphologie, dans la mesure du possible. Donc, la

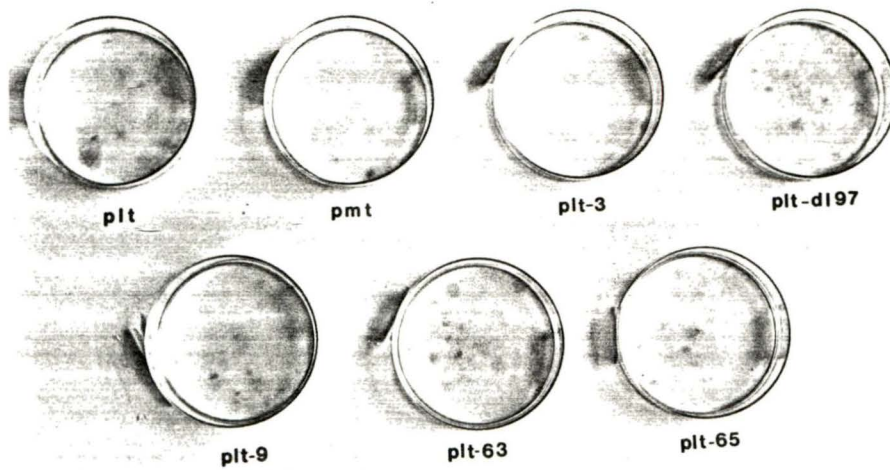


FIG. 17. Coloration de cellules transfectées avec différents mutants de plt. 3 à 4 semaines après la transfection au G-418, les cellules sont fixées avec une solution de formol-saline 10% et colorées au Giemsa dilué 1:5. Le nombre de colonies varie selon l'ADN transfecté, étant maximum avec plt-d197 et minimum avec plt-AvaI.

sélection s'effectue à deux niveaux, la résistance au G-418 et la capacité de croissance, celle-ci étant influencée par la qualité du gène cotransfecté avec pSV2neo.

Trois à quatre semaines après la sélection, nous avons passé les clones et observé leur comportement. La majorité des lignées obtenues par transfection de pSV2neo n'a pas supporté le premier passage (75 lignées sur 79, 95%). Les cellules ont subi quelques divisions avant d'arrêter leur croissance. 3 lignées sur 79 sont entrées en crise après 2 ou 3 passages. Les lignées obtenues par transfection du gène *plt* et ayant plus de 5 passages (39 lignées sur 114, 34%) (Figure 18) ont montré un potentiel de croissance illimitée et ont pu être gardées en culture pendant plus de 10 passages. Ces lignées ne sont jamais entrées en crise alors que le reste des lignées (75 lignées sur 114, 66%) a arrêté de croître après 1 à 4 passages. Curatolo et al. (1984) ont montré que des cellules primaires entraient en crise avant d'atteindre 5 passages ou 10 divisions cellulaires. Nous avons donc convenu que les lignées étaient considérées comme immortalisées après 5 passages.

Comme 34% des lignées *plt* sont immortalisées, nous nous sommes demandés si le gène *plt* était exprimé dans toutes les lignées, qu'elles soient immortalisées ou non. Nous avons recueilli 22 lignées obtenues d'une transfection avec *plt/neo* et nous avons cherché à savoir, par immunofluorescence, si elles exprimaient l'antigène grand T dès le premier passage. Sur 22 lignées, il y en a 6 qui présentent une fluorescence nucléaire manifeste (1, 2, 3, 9, 11 et 14). Les autres lignées ont une fluorescence très faible. Nous avons aussi vérifié la

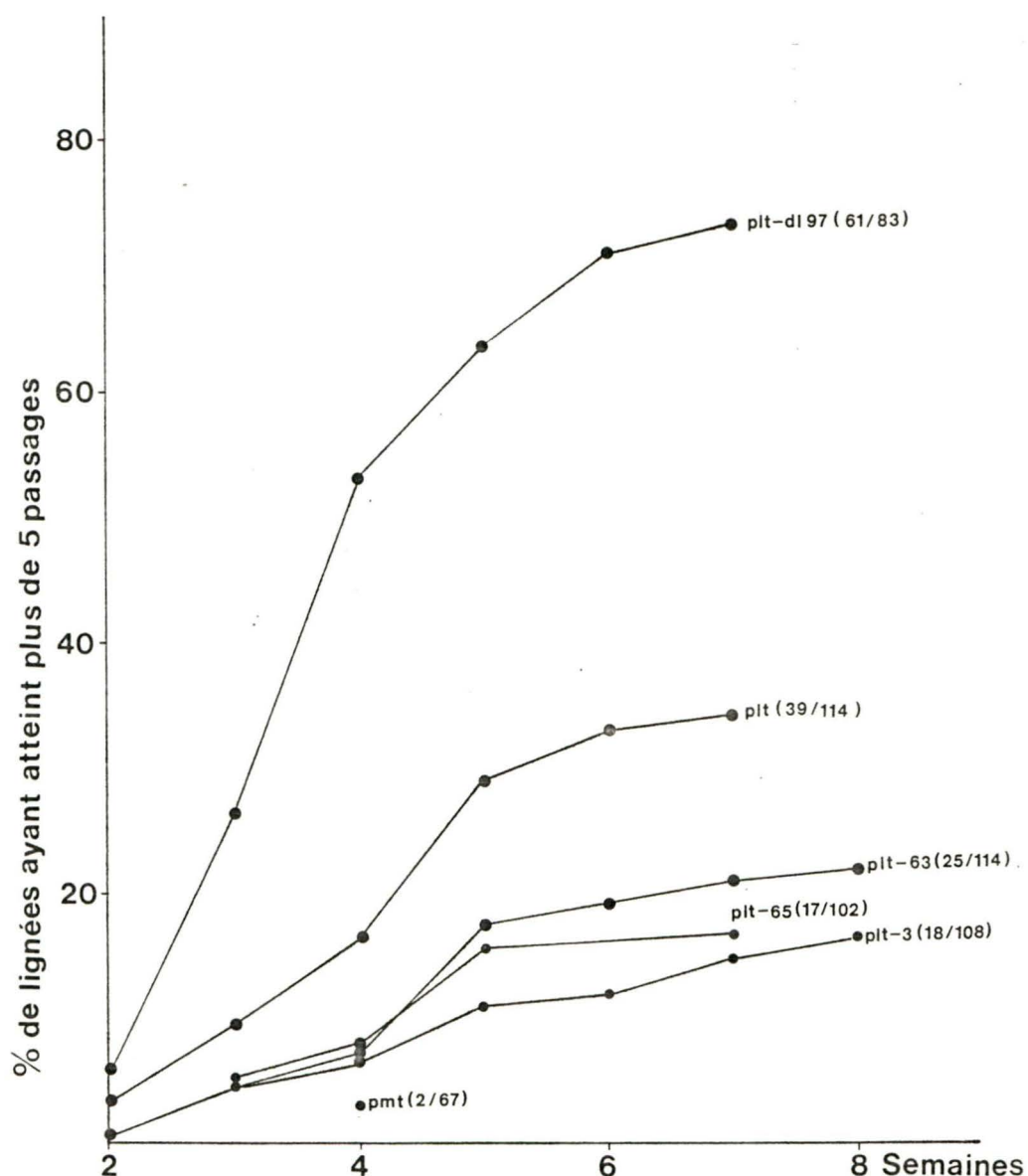


FIG. 18. Immortalisation de cellules primaires avec les mutants de délétion de plt. Les colonies résistantes au G-418 ont été clonées, sans tenir compte de leur morphologie, dans la mesure du possible, et passées dans des puits de 1.67 cm^2 de surface. Les cellules ayant atteint la confluence ont été passées 1:5 pendant au moins 10 passages, pour s'assurer de leur immortalité. Les cellules avec plus de 5 passages sont considérées immortalisées. Le graphique montre le pourcentage de lignées ayant atteint plus de 5 passages, donc immortalisées, en fonction du nombre de semaines après le clonage. Il est aussi indiqué le total des lignées immortalisées sur le nombre total de lignées clonées. plt-d197 immortalise deux fois mieux que plt. plt-63 et pltl-65 immortalisent aussi bien que plt3. pmt est capable d'immortaliser à une faible fréquence.

capacité de croissance des 22 lignées plt. Nous avons constaté l'immortalisation de 8 lignées (1, 2, 3, 9, 11, 17, 20, 21). Les 5 premières lignées établies (1, 2, 3, 9, 11) ont une fluorescence manifeste alors que la fluorescence des lignées 17, 20 et 21 n'est pas évidente. La lignée 14, avec une fluorescence nucléaire importante, n'a pu être établie. Donc, il semble y avoir une relation entre la cellule qui arrive rapidement à l'immortalisation et l'expression du gène plt dès le premier passage (lignées 1, 2, 3, 9, 11). Mais cette relation n'est pas parfaite puisque les lignées 17, 20 et 21 peu fluorescentes sont immortalisées et que la lignée 14, qui est très fluorescente, ne l'est pas.

ii) Des séquences de plt entre AvaI (1016) et SstI (1373) sont essentielles à l'immortalisation.

Nous avons voulu déterminer les régions minimales du gène plt nécessaires à l'immortalisation en utilisant l'essai biologique décrit précédemment. Nous avons transfecté des cellules primaires avec des recombinants contenant des mutants de délétion liés au plasmide pSV2neo dans une orientation tête-à-queue et nous avons isolé des colonies résistantes au G-418 afin d'évaluer leur potentiel de croissance. Les mutants plt-9 et plt-AvaI, dont les séquences en 3' du site AvaI (1016) sont délétées, n'immortalisent pas des cellules primaires de rat. 3 lignées sur 148 ont atteint 5 passages après plus de 8 semaines en culture. Une seule de ces lignées (plt-AvaI) a survécu après avoir subi un arrêt de croissance et une diminution de la densité cellulaire, suivie de l'apparition d'îlots de croissance. A chaque passage

subséquent, la cellule a réagi de la même façon en formant des clones. Ce comportement est différent de celui de cellules immortalisées avec le gène *plt* puisque, dans ce dernier cas, toutes les cellules semblent avoir un potentiel de croissance identique. Celles-ci ne forment pas de clone et ne subissent pas de crise. La lignée *plt-AvaI* provient probablement d'un événement d'immortalisation spontanée. La fréquence de cet événement est de l'ordre de 1/148 ou 0.6%. Ces résultats suggèrent donc que des séquences en 3' du site AvaI (1016) du gène *plt* sont nécessaires à l'immortalisation.

Le gène *plt* de polyome immortalise avec une efficacité de 34% (Figure 18). L'antigène grand T a été mis en évidence dans le noyau des cellules immortalisées, par immunofluorescence. *plt3*, qui encode un antigène grand T tronqué, immortalise avec une efficacité moindre que celle de *plt* (18 lignées sur 108, 16.5%). Ceci est peut-être dû à la production d'une protéine moins stable ou moins efficace dans l'immortalisation que la protéine complète. Les mutants de délétion *plt-63* et *plt-65* immortalisent à une fréquence voisine de celle de *plt3*, soit 21.9% (25 lignées sur 114) et 16.7% (17 lignées sur 102) respectivement (Figure 18). Ces deux mutants ont des délétions entre les sites EcoRI (1559) et SstI (1373) (Figure 13), ce qui implique que ces séquences ne sont pas essentielles à l'immortalisation. Par ailleurs, le mutant *plt3/AvaI-SstI*, qui a une délétion des séquences entre AvaI (1016) et SstI (1373), n'a pas immortalisé (0/72). Ces résultats démontrent que les séquences du gène *plt* entre les sites AvaI (1016) et SstI (1373) sont essentielles au phénomène d'immortalisation.

Dans le but de délimiter davantage les séquences minimales du gène *plt* nécessaires à l'immortalisation, nous avons introduit des délétions dans le plasmide pLT3 à partir du site SstI (1373). Nous avons voulu déterminer si le domaine essentiel à l'immortalisation était situé dans la région unique à polyome entre les nucléotides (nt) 795 et 1264, ou dans la région présentant une certaine homologie de séquences avec SV40, entre les nt 1265 et 1373 (Soeda et al., 1980). Nous avons analysé les capacités d'immortalisation de 7 mutants de délétion (Figure 16) et avons trouvé qu'ils immortalisent avec une efficacité égale ou inférieure à celle de *plt3* (de 3 à 15%). Les différences entre les niveaux d'immortalisation dépendent probablement de la stabilité de la protéine produite. Le fait que le mutant *plt3-221*, dont la délétion commence vers le nt 1200, immortalise, suggère que le domaine d'immortalisation est situé entre le site AvaI (1016) et le nt 1200-1210, dans une région unique au virus du polyome et possiblement d'origine cellulaire (Soeda et al., 1980). De plus, ceci implique que seulement 27% de la région codante du gène *plt* est suffisant pour immortaliser des cellules primaires de rat.

iii) Le gène T moyen (*pmt*) peut immortaliser à une faible fréquence.

Le gène T moyen est incapable de transformer des cellules primaires de rat *in vitro* (Rassoulzadegan et al., 1982) et d'induire la formation de tumeurs chez le rat, mais peut être tumorigène chez le hamster, après une longue période de latence (Asselin et al., 1984). Nous avons voulu savoir si, dans l'essai d'immortalisation, le gène *pmt* pouvait conférer aux cellules primaires une capacité de croissance

continue. 2 lignées sur 67 (3%) ont été immortalisées (Figure 18). Elles sont apparues aussi rapidement que les lignées immortalisées avec le gène *plt*, sans entrer en crise. L'antigène T moyen a été surtout mis en évidence dans le cytoplasme de la lignée 2-12 par immunofluorescence. Le phénotype des deux lignées est différent. La lignées 2-7 ne s'empile pas, la cellule reste étalée et ressemble morphologiquement à des cellules immortalisées avec le gène *plt* (Figure 19). La lignée 2-12 s'empile, épuise rapidement le milieu et a un aspect de cellule transformée (Figure 19). Par contre, elle n'est pas tumorigène chez la souris nue, suite à l'injection de 50,000 cellules.

Un mutant du gène *pmt*, *pmt-AvaI*, dans lequel on a introduit un changement de cadre de lecture par inactivation du site AvaI (1016) (Figure 16), n'immortalise pas (0/72). La mutation rétablit le cadre de lecture de *plt* en 3' du site AvaI (1016). Cela laisse supposer que ces séquences ne peuvent compléter celles de *pmt* en 5' du site AvaI peut-être parce que la structure de la protéine est différente. Cela suggère aussi que le gène *pmt* a le potentiel intrinsèque de conférer à des cellules primaires de rat une capacité de croissance indéfinie par un mécanisme différent et moins efficace que celui du gène *plt*.

iv) Un mutant de délétion du gène *plt* a un potentiel d'immortalisation accru et peut compléter le gène T moyen dans la tumorigénèse.

L'analyse de la carte de restriction du mutant *plt-d197* a démontré la présence d'une courte délétion d'environ 35 pb au niveau du site SstI (1373) (Figure 12). Ce mutant de *plt* immortalise 61 lignées

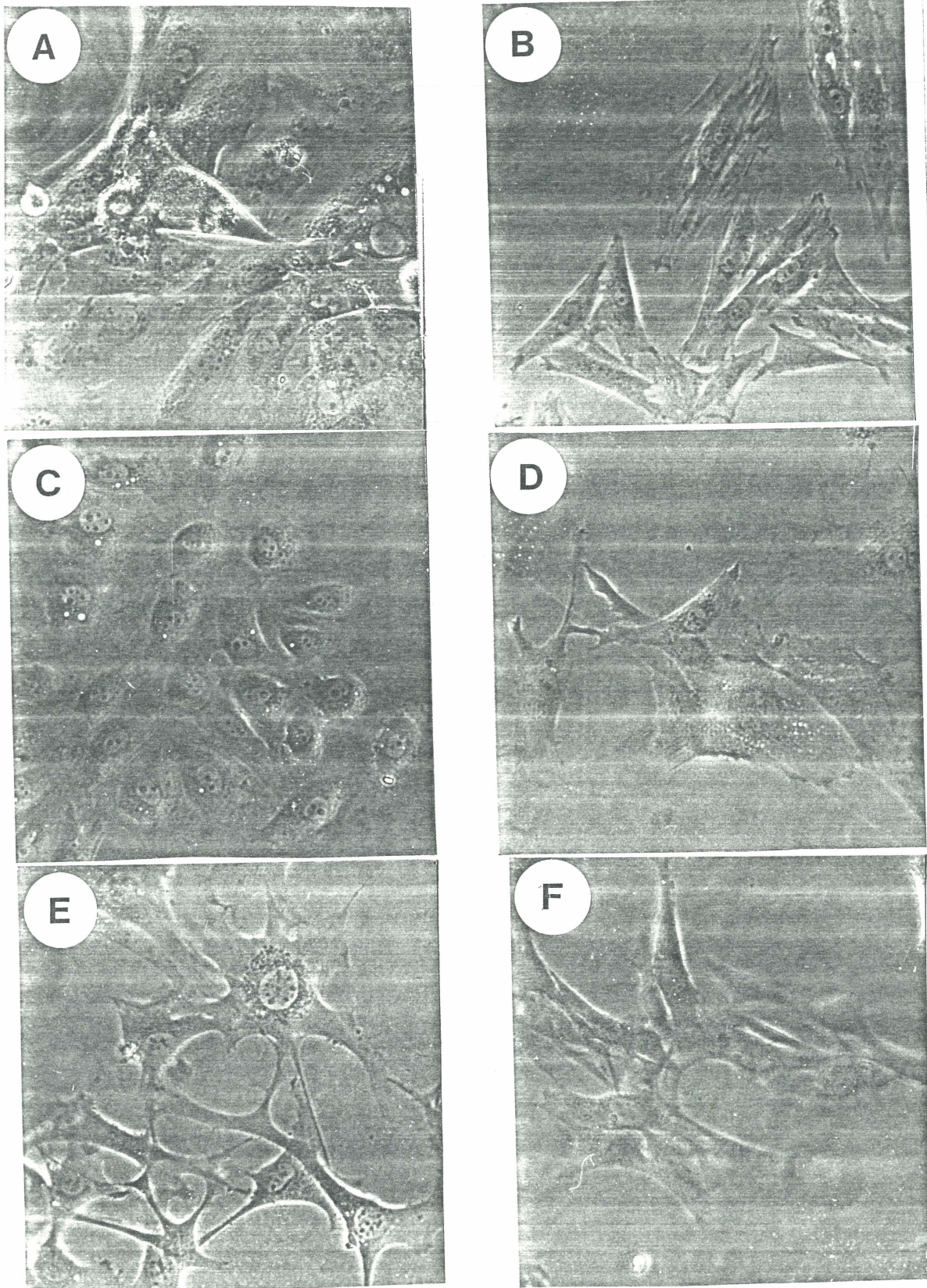


FIG. 19. Photographies en contraste de phase (150 X) de cellules immortalisées avec différents recombinaunts. (A) Non-immortalisée; (B) plt-dl97; (C) plt3; (D) pmt 2-7; (E) pmt 2-12; (F) $\Delta 2005$.

sur 83 (73.5%), donc avec une efficacité deux fois plus grande que celle de plt (Figure 18). On observe aussi 2 fois plus de colonies résistantes au G-418 en transfectant pltl-dl97neo (80-90 colonies par transfection) qu'en transfectant plt-neo (40-50 colonies par transfection). Nous avons pu mettre en évidence l'antigène grand T de ce mutant par immunofluorescence de 2 lignées immortalisées choisies au hasard. Nous avons alors déterminé la localisation précise de la délétion en faisant la séquence du mutant. Nous avons isolé un fragment AccI (368-1500) et nous l'avons marqué à la transférase terminale avec un $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$. Nous avons coupé le fragment avec AvaI (1016), isolé un fragment AvaI-AccI (1016-1500) de près de 450 pb sur gel de polyacrylamide 4% et séquencé selon la méthode de Maxam et Gilbert (1980). Le mutant plt-dl97 a une délétion en phase de 30 pb, entre les nt 1367 et 1396, qui enlève les 10 acides aminés suivants: Ser-Gln-Ser-Ser-Phe-Asn-Ala-Thr-Pro-Pro (Figure 20, 28). Cette délétion semble donc être responsable de l'augmentation d'activité de ce mutant dans l'immortalisation.

Etant donné que plt-dl97 a une efficacité d'immortalisation deux fois supérieure à celle de plt, nous avons vérifié si ce mutant pouvait compléter le gène pmt dans la tumorigénèse. Nous avons inséré dans le site BamHI de pMT3 le gène plt-dl97. Le plasmide obtenu, pMLT-dl97, a été linéarisé avec ClaI et injecté à des rats nouveau-nés. Nous avons été surpris de constater l'apparition de 5 tumeurs sur 7 rats injectés. Les tumeurs sont apparues dans un intervalle de trois mois. Donc, alors que le gène plt ne peut pas compléter le gène pmt dans la tumorigénèse, le mutant plt-dl97, avec une délétion de 30 pb, peut le faire de façon très efficace. Cette complémentation semble être associée à sa capacité accrue d'immortalisation (Voir Discussion).

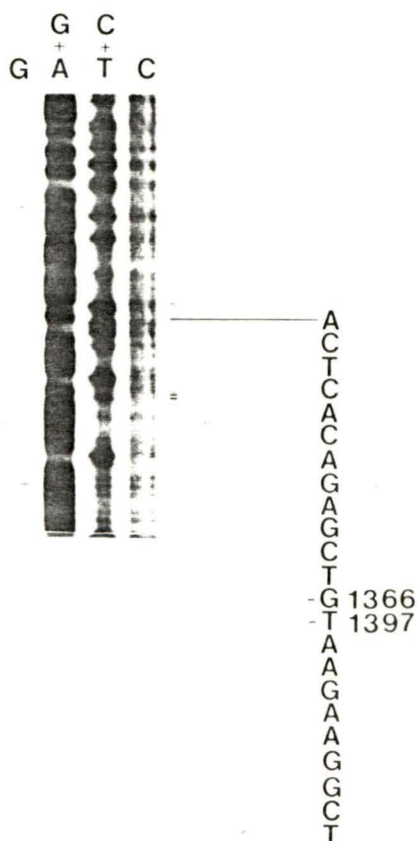


FIG. 20. Autoradiogramme de la séquence du mutant *plt-d197*. Le mutant *plt-d197* a été digéré complètement avec AccI. Un fragment AccI (368-1500) a été marqué à la transférase terminale avec 125 μ Ci de [α - 32 P] ddATP, redigéré avec AvaI et un fragment AvaI-AccI (1016-1500) de près de 450 pb a été isolé sur gel de polyacrylamide 4% et séquencé selon la méthode de Maxam et Gilbert (1977). Les produits ont été séparés sur un gel de polyacrylamide à 8%. Les nucléotides, qui représentent la limite de la délétion, sont indiqués.

II. Détermination de la région minimale du gène grand T de SV40 nécessaire à l'immortalisation.

1. Description des mutants de délétion du gène grand T de SV40.

La région 5' du gène grand T de SV40 jusqu'au site HpaI (3733) est suffisante à l'immortalisation de cellules primaires de rat (Colby et Shenk, 1982) et peut compléter le gène T moyen du virus du polyome dans la tumorigénèse (Asselin et al., 1984). Afin de définir la nature de la complémentation entre le gène grand T de SV40 et le gène pmt, nous avons entrepris de délimiter les séquences du gène grand T nécessaires à l'immortalisation. Nous avons utilisé le plasmide pMSV2-b, dérivé de pMSV2 (Figure 9) par l'insertion d'un adaptateur XhoI de 8 pb au site HpaI (3733) du gène grand T de SV40 ($\Delta 2005$). Nous avons généré des délétions à la nucléase Bal31 à partir du site XhoI. Dans les conditions de mutagénèse observées (1 U de nucléase Bal31, pendant 1 à 4 minutes), nous avons obtenu la disparition d'environ 184 pb/minute/extrémité bicaténaire.

Xho45: Alors que $\Delta 2005$, le mutant de SV40 n'encodant que le gène grand T, possède 2 fragments HindIII, l'un de 939 pb (4002 à 5171, moins la délétion de 230 pb dans l'intron) et l'autre de 526 pb (3476 à 4002), ceux-ci sont absents dans le mutant Xho45. Un fragment de près de 1120 pb, qui comigre avec celui de 1118 pb (5171 à 1046), remplace ces 2 fragments HindIII qui totalisent 1465 pb. Il y a une délétion d'environ 340 pb qui inactive le site HindIII (4002) mais conserve les sites HindIII à 3476 et 5171 (Figure 21). Le site XhoII (4099) est cependant

présent. Le fragment HinfI de 766 pb (3610 à 4376) est réduit à 430 pb, ce qui indique que le site HinfI (3610) est conservé (Figure 21). Donc, Xho45 a une délétion de 340 pb entre les sites HinfI (3610) et XhoII (4099) (Figure 22).

Xho3: Xho3 a un fragment HpaI de 2150 pb au lieu de 2846 pb (2666 à 499, moins la délétion de l'intron), soit une délétion d'environ 700 pb (Figure 20). Le site XhoII (4099) est inactivé alors que le site PstI (3204) est présent. La digestion avec AluI montre la délétion de 2 fragments, l'un de 273 pb (3780–3507) et l'autre de 223 pb (4003–3780) (Figure 21). Comme le site XhoII (4099) est inactivé, le fragment AluI de 157 pb (4160–4003) est aussi délété. Toutefois, on trouve à la même position le fragment de 154 pb qui comigre (4314–4160), ce qui indique que le site AluI (4160) est présent. Comme le fragment AluI (3426) à HpaI (2666) de 760 pb est conservé, le site AluI (3426) est intact. Mais la limite de la délétion en 3' n'est pas bien définie à cause de la présence de plusieurs sites AluI rapprochés (3426, 3436, 3477 et 3507). La délétion de Xho3 enlève près de 700 pb entre les sites AluI (3426) et AluI (4160) (Figure 22).

Xho24: Xho24 a un nouveau fragment HpaI de 1600 pb au lieu de 2846 pb, donc une délétion de près de 1240 pb (Figure 21). Les sites XhoII (4099) et PstI (3204) sont délétés mais le site RsaI (3072) est conservé. 4 fragments HinfI sont délétés: 766 pb (3610–4376), 525 pb (2848–3373), 237 pb (3373–3610) et 83 pb (4376–4459) (Figure 21). La présence d'un nouveau fragment HinfI de 370 pb, qui remplace une région

qui comporte 1611 pb, suggère une délétion d'environ 1240 pb. La délétion de Xho24 se situe entre les sites HinfI (4459) et RsaI (3072) (Figure 22).

Xho35: Le mutant de délétion Xho35 a un nouveau fragment HinfI de 160 pb, qui comigre avec celui de 158 pb (HinfI (2824) à HpaI (2666)) (Figure 21). La délétion enlève les fragments HinfI de 766 pb (3610-4376), 83 pb (4376-4459) et 109 pb (4459-4568). Elle inactive le site HinfI à 4459, site présent dans Xho24, et s'étend entre les sites HinfI (3610) et HinfI (4568), sur près de 800 pb (Figure 22).

Xho28: En plus d'enlever les mêmes fragments HinfI que ceux de Xho35, la délétion de Xho28 inactive le site HinfI à 4568 (Figure 21). Le fragment HinfI de 313 pb (4592-5135, moins la délétion de 230 pb dans l'intron) disparaît. Un nouveau fragment de 400 pb remplace les 1295 pb de tous ces fragments HinfI. La délétion d'environ 890 pb de Xho28 se situe donc entre les sites HinfI (3610) et HinfI (5135) et se rend au moins jusque dans l'intron (Figure 22).

2. Immortalisation de cellules primaires de rat avec les mutants de délétion du gène grand T de SV40.

i) La région N-terminale de l'antigène grand T de SV40 est suffisante à l'immortalisation.

Nous avons utilisé l'essai d'immortalisation déjà décrit, en transfectant des cellules primaires de rat avec 8 μ g d'ADN contenant les

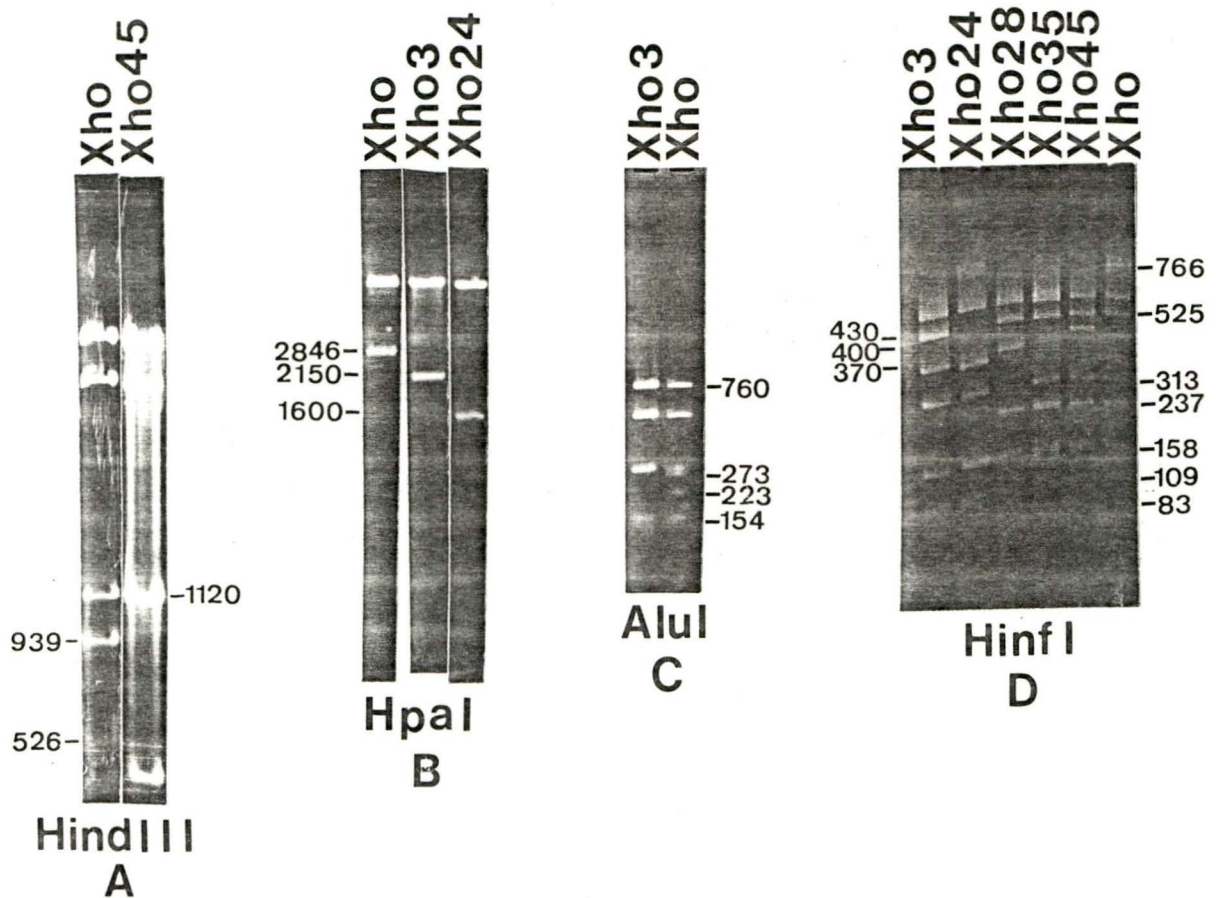


FIG. 21. Analyse de restriction des mutants de délétion du gène grand T de SV40. Les mutants de délétion ont été obtenus par mutagenèse à la Bal31 à partir du site XhoI de pMSV2-b. (A) Xho45 a été digéré avec HindIII et les fragments ont été séparés sur gel d'agarose 1.4%. Les 2 fragments HindIII de 939 pb (4002 à 5171) et 526 pb (3476 à 4002) sont remplacés par un fragment de 1120 pb qui comigre avec celui de 1118 pb (5171 à 1046). (B) Xho3 et Xho24 ont été digérés avec HpaI et les fragments ont été séparés sur gel d'agarose 1%. Le fragment HpaI de 2846 pb (2666 à 499) est réduit à 2150 pb pour Xho3 et 1600 pb pour Xho24. (C) Le fragment HpaI de Xho3 (2666-499) a été isolé sur gel d'agarose fondant 1%, digéré avec AluI et les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose 1.4%. Les fragments AluI de 273 pb (3780-3507), de 223 pb (4003-3780) et probablement de 157 pb (4160-4003) sont délétés dans Xho3. (D) Les fragments HpaI des différents mutants ont été isolés sur gel d'agarose fondant 1%, digérés avec HinfI et les fragments ont été séparés sur gel de polyacrylamide 4%. Le fragment HinfI de 766 pb (3610-4376) disparaît chez tous les mutants. L'analyse des fragments HinfI des différents mutants est donnée dans le texte.

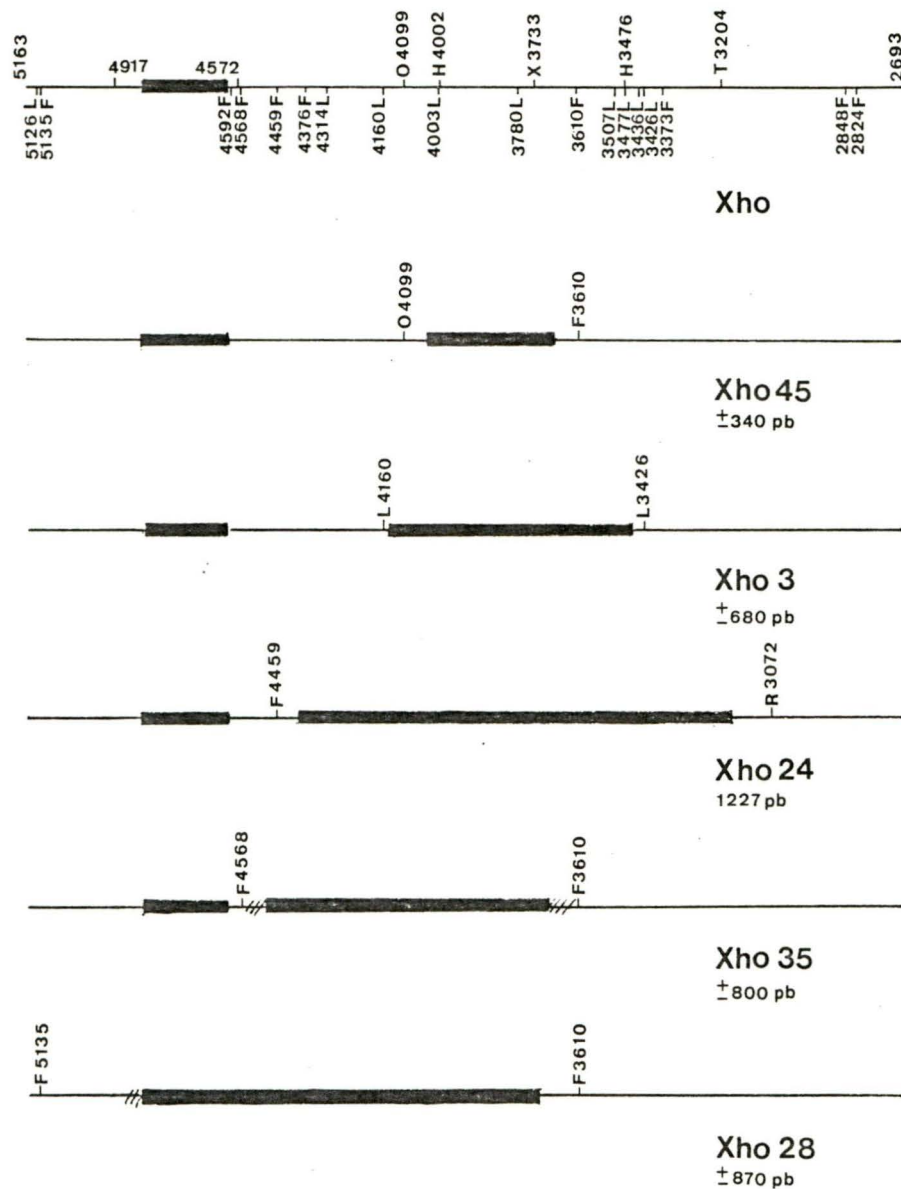


FIG. 22. Carte de restriction des mutants de délétion du gène grand T de SV40. Les zones foncées et hachurées montrent l'étendue des délétions. La région foncée, entre les nucléotides 4917 et 4572 de l'intron, représente la délétion de 230 pb de Δ 2005. La grandeur approximative des délétions, en paire de bases (pb), est aussi indiquée: Abréviations: F, HinfI; H, HindIII; L, AluI; O, XhoII; T, PstI; X, XhoI.

mutants de délétion insérés dans le site BamHI de pSV2neo, dans une orientation tête-à-queue. Nous avons obtenu plus de 250 colonies résistantes au G-418 par transfection de cellules primaires de rat avec Δ 2005, qui encode l'antigène grand T de SV40. Les 20 colonies recueillies ont poussé indéfiniment en culture et possédaient un phénotype transformé (Figure 19). L'introduction de délétions dans le gène grand T résulte en une diminution considérable du nombre de colonies (Figure 23).

Le mutant Xho45 immortalise 20 lignées sur 78 (26%) et Xho3, 9 sur 57 (16%). (Figure 24). Ces résultats démontrent que les séquences en 3' du site XhoII (4099) ne sont pas nécessaires à l'immortalisation. La différence d'efficacité entre Xho45 et Xho3 dépend peut-être de la stabilité de la protéine produite.

Xho24 immortalise avec une efficacité de 51% (28 lignées sur 55). Etant donné que ce mutant comporte la plus grande délétion, nous en avons déterminé la séquence selon la méthode de Maxam et Gilbert (1977). Nous avons extrait d'un gel d'agarose fondant un fragment HinFI de 340 pb entre les sites HinFI (4459) et HinFI (2848), marqué les extrémités à la transférase terminale avec un $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ddATP, et recoupé avec RsaI (3072). Un fragment RsaI (3072)-HinFI (4459) de près de 120 pb a été extrait d'un gel de polyacrylamide 4% et séquencé. La séquence a montré une délétion de 1227 pb entre les nucléotides 4407 et 3180 (Figure 25). La mutation change aussi le cadre de lecture: 6 nouveaux acides aminés (Leu-Gly-Pro-Lys-Ile-Ile) sont ajoutés avant d'atteindre un codon de terminaison TAA (Figure 28). Ce gène tronqué coderait pour une protéine

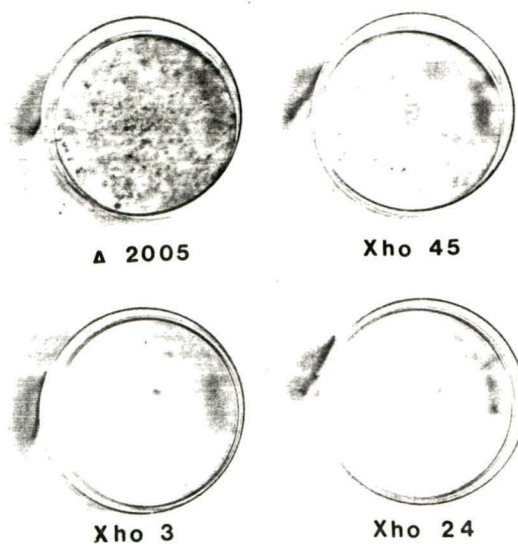


FIG. 23. Coloration des cellules transfectées avec différents mutants de délétions du gène grand T de SV40. 3 à 4 semaines après la transfection au G-418, les cellules ont été fixées avec une solution de formol-saline 10% et colorées au Giemsa dilué 1:5. Le nombre de colonies diminue grandement dès qu'une délétion est introduite dans le gène grand T de SV40.

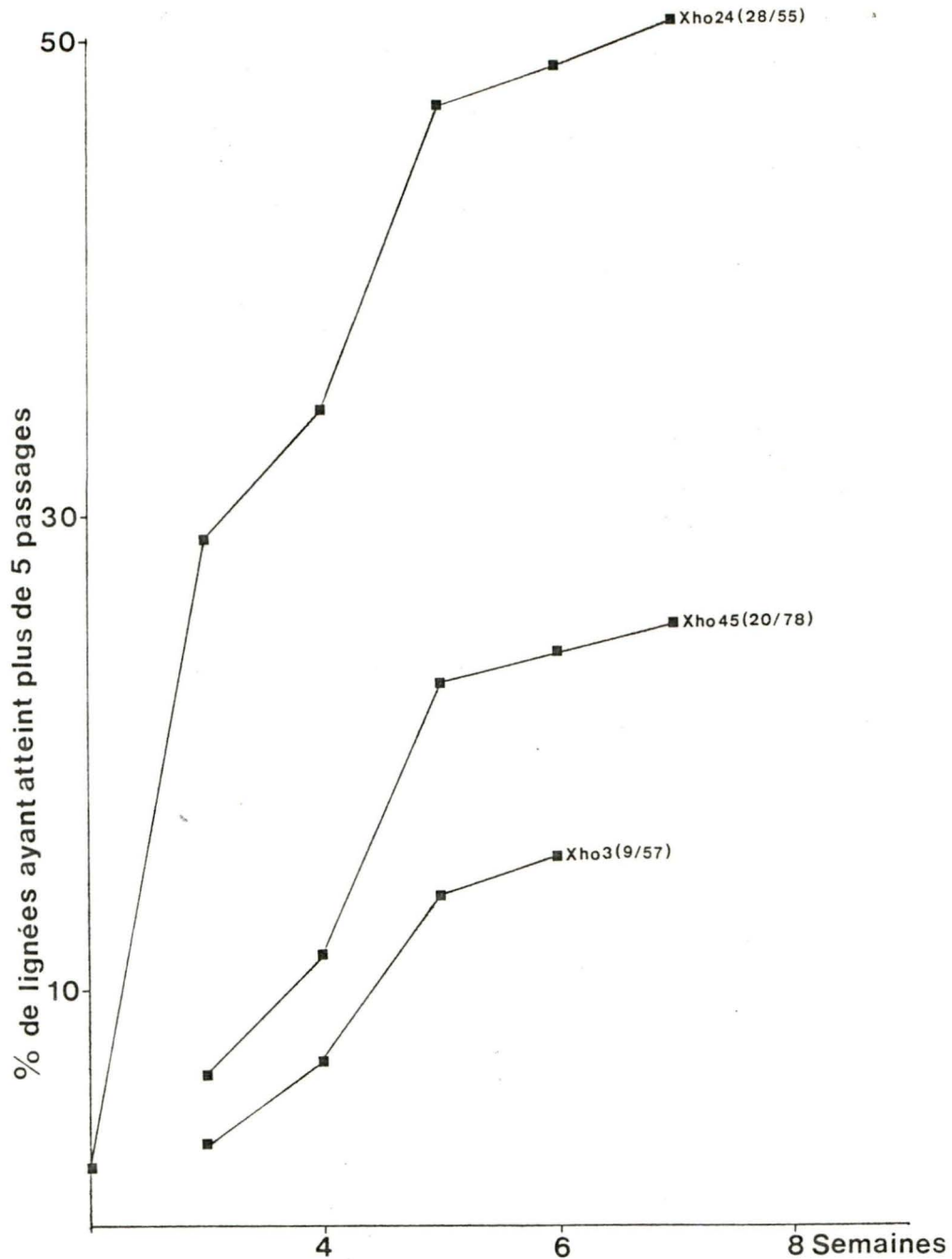


FIG. 24. Immortalisation de cellules primaires avec les mutants de délétion du gène grand T de SV40. Les colonies résistantes au G-418 ont été clonées, sans tenir compte de leur morphologie, dans la mesure du possible, et passées dans des puits de 1.67 cm^2 de surface. Les cellules ayant atteint la confluence ont été passées 1:5 pendant au moins 10 passages, pour s'assurer de leur immortalité. Les cellules avec plus de 5 passages sont considérées immortalisées. Le graphique montre le pourcentage de lignées ayant atteint plus de 5 passages, donc immortalisées, en fonction du nombre de semaines après le clonage. Le nombre des lignées immortalisées par rapport au total des lignées clonées est aussi indiqué. Le mutant Xho24 immortalise mieux que Xho3 et Xho45.

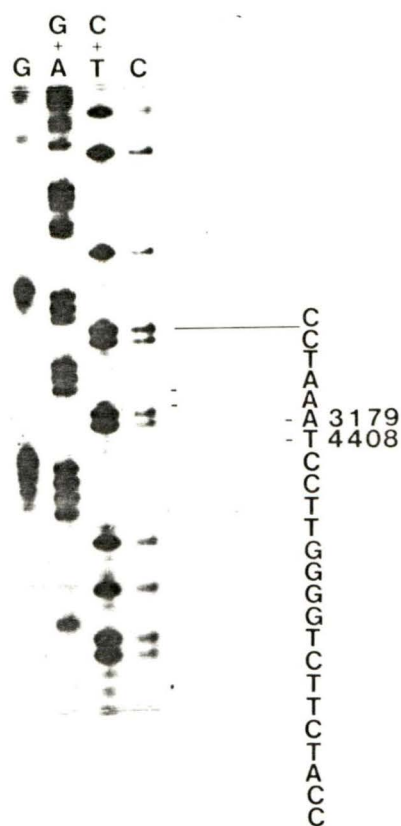


FIG. 25. Autoradiogramme de la séquence du mutant Xho24. Le fragment HpaI (499-2666) du mutant Xho24 a été digéré avec HinfI et un fragment HinfI de 340 pb, isolé d'un gel d'agarose fondant 1.4%, a été marqué à la transférence terminale avec un [α - 32 P]ddATP. Ce fragment a été digéré avec RsaI et un fragment RsaI-HinfI (3072-4459) de près de 120 pb a été isolé sur gel de polyacrylamide 4% et séquencé selon la méthode de Maxam et Gilbert (1977). Les produits ont été séparés sur un gel de polyacrylamide 8%. Les nucléotides qui représentent la limite de la délétion, sont indiqués.

de 143 acides aminés, avec un poids moléculaire de 16.5 KD. Nous avons mis en évidence dans des lignées immortalisées avec Xho24, une protéine d'environ 20 KD, par immunoprécipitation à l'aide d'un antisérum de hamster contre les protéines précoces de SV40 (Figure 26).

Afin de déterminer quelles étaient les séquences importantes à l'immortalisation et présentes dans Xho24, nous avons vérifié la capacité d'immortalisation de Xho35 et Xho28. Xho35 n'immortalise pas (0/81), alors que Xho28, qui a une délétion au moins jusque dans l'intron de grand T, immortalise avec une fréquence de 3.5% (4 lignées sur 114). Ces lignées ont été obtenues en même temps que celles immortalisées avec d'autres mutants positifs de SV40, et ne sont pas entrées en crise. Cependant, 3 des 4 lignées proviennent de la même boîte de transfection et pourraient être des clones soeurs. Ceci suggère que les régions du génome de SV40 qui sont conservées dans Xho28 gardent une capacité d'immortalisation qui est peut-être due à la présence de deux origines de réplication ou de deux "enhancer" de SV40 dans le même recombinant. Ces résultats sont à mettre en rapport avec ceux de Colby et Shenk (1982) qui ont rapporté que l'origine de réplication de SV40 pouvait immortaliser assez efficacement des cellules primaires de rat. Les séquences du gène grand T en 3' de l'intron, particulièrement entre le site HinfI (4568) et le nt 4407 sont essentielles et augmentent de 5 à 10 fois l'efficacité d'immortalisation trouvée avec Xho28. Seulement 19% de la région codante du gène grand T de SV40 est suffisante à l'immortalisation.

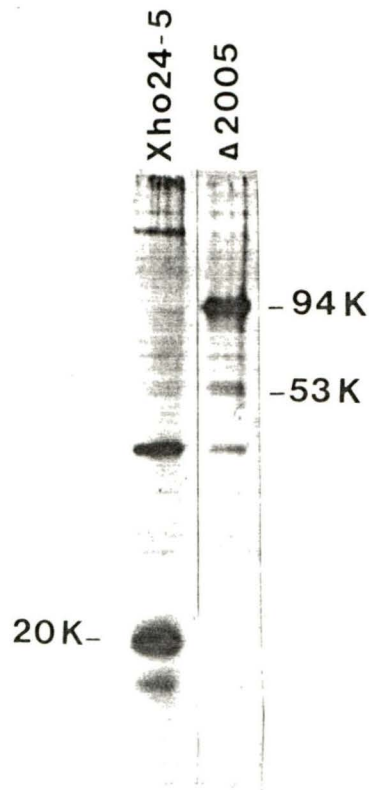


FIG. 26. Protéines virales synthétisées dans une lignée immortalisée avec le mutant Xho24. La lignée cellulaire Xho24 a été obtenue par la transfection de cellules primaires avec le mutant de délétion du gène grand T de SV40, Xho24. Les cellules ont été marquées à la [35 S]-méthionine (0.1 mCi par boîte) pendant 90 minutes à 37°C. Les protéines ont été extraites, précipitées avec un sérum anti-T de SV40 et séparées sur gel de polyacrylamide-SDS 12.5%. Les flèches indiquent les positions de l'antigène grand T de SV40 (94K), de la protéine p53 (53K) et de l'antigène tronqué de la lignée Xho24 (20K).

ii) Un mutant du gène grand T de SV40, déficient dans le transport au noyau, peut transformer des cellules primaires de rat.

Il existe un mutant de SV40 qui produit un antigène grand T incapable de se localiser dans le noyau. Le remplacement de l'acide aminé 128, une lysine, en asparagine, est suffisant pour abolir le transport au noyau (Lanford et Butel, 1984). Nous avons voulu vérifier si ce mutant de SV40, qui peut transformer des cellules en culture, pouvait compléter le gène T moyen dans la tumorigénèse. Nous avons inséré dans le site BamHI de pMT3, le fragment BamHI de pBSVcT-3, qui encode le petit T et l'antigène grand T mutant (Lanford et Butel, 1984). Nous avons digéré le recombinant avec ClaI et l'avons injecté à des rats nouveau-nés. Une seule tumeur sur 24 rats injectés est apparue, comparativement à 8/17 avec pMSV1, qui encode le T moyen et les antigènes petit T et grand T de SV40. Le défaut de transport au noyau de ce mutant réduit le potentiel de complémentation du grand T de SV40. Il est aussi possible que le petit T qui est encodé par le recombinant puisse avoir un effet stimulateur.

Nous avons voulu savoir si le plasmide pBSVcT-3 pouvait transformer des cellules primaires de rat. Nous avons cotransfecté celles-ci avec pBSVcT-3 (6 µg) et pSV2neo (2 µg) et isolé des colonies résistantes au G-418. Alors que SV40 donne plus de 280 colonies résistantes au G-418 par transfection et que toutes ces colonies ont un aspect transformé, environ 80 colonies par transfection (30% de SV40) ont été obtenues avec pBSVcT-3. L'aspect des colonies est aussi plus variable: près de 40% des colonies forme des foyers et sont transformées

53lors que les autres semblent au moins immortalisées. Nous avons vérifié, dès le premier passage, la présence de l'antigène grand T de SV40 dans les lignées transformées avec pBSVcT-3 par immunofluorescence, en utilisant un antisérum polyclonal provenant d'un hamster. Alors que les cellules transformées par SV40 présentent une fluorescence nucléaire manifeste, celles qui sont transformées par pBSVcT-3 n'ont pas de fluorescence. Nous avons analysé 7 lignées pBSVcT-3 qui ont pu être gardées en culture indéfiniment. Il semble donc que la présence de l'antigène grand T de SV40 dans le noyau ne soit pas nécessaire pour transformer des cellules primaires in vitro. La mutation affecte cependant l'efficacité de transformation de cellules primaires. Toutefois, l'antigène grand T de SV40 doit pénétrer dans le noyau afin de compléter de façon efficace le gène pmt dans la tumorigénèse in vivo.

Troisième partie

Le petit T et un mutant du gène grand T de polyome peuvent compléter le gène pmt dans la transformation de cellules primaires de rat in vitro.

Jusqu'à maintenant, nous avons trouvé que le petit T et un mutant du gène plt, dl97, pouvaient compléter le gène pmt dans la tumorigénèse, alors que le gène plt lui-même ne pouvait le faire. Cuzin et al. (1984) ont rapporté que les gènes petit T et grand T ne pouvaient pas compléter le gène pmt dans la transformation de cellules primaires in vitro, par un essai de formation de foyers. Nous avons voulu savoir si bc1051 (T moyen et petit T), pMLT1 (T moyen et grand T) et pMLTdl97 (T moyen et grand T dl97) pouvaient transformer des cellules primaires de rat, en utilisant notre essai de sélection au G-418. Nous avons inséré dans le site BamHI de pSV2neo le génome de bc1051, dans une orientation tête-à-queue. Nous avons transfecté des cellules primaires de rat avec 8 µg de bc1051neo ou cotransfecté avec 6 µg de pMLT1 ou pMLTdl97 et 2 µg de pSV2neo. Nous avons ensuite sélectionné les cellules résistantes au G-418.

bc1051 a conféré aux cellules transfectées un effet mitogène remarquable (Figure 27). Après 3 semaines, les cellules sont à confluence, comme s'il n'y avait pas eu de sélection et certains foyers sont apparus sur le tapis cellulaire. Nous avons recueilli 24 de ces foyers pour vérifier leur potentiel de croissance. 6 d'entre eux montrent un potentiel illimité de croissance et sont immortalisés. Donc,

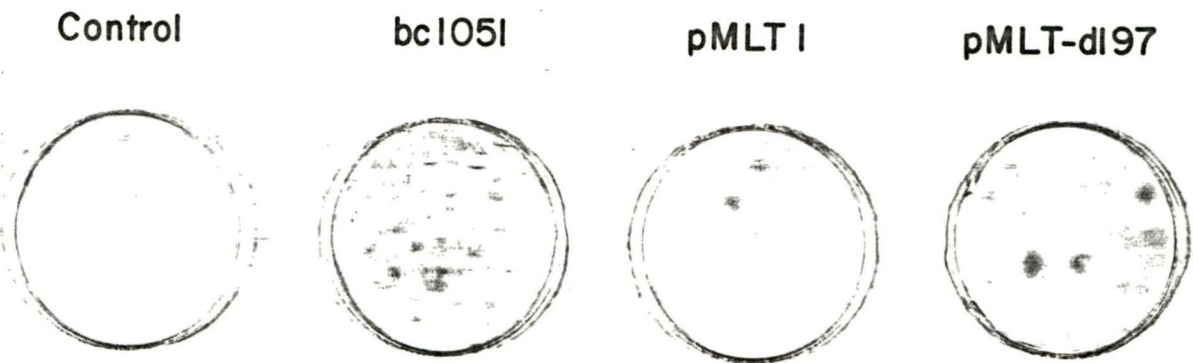


FIG. 27. Coloration de cellules transfectées avec pMLT1, pMLTd197 et bc1051. 3 à 4 semaines après la sélection au G-418, les cellules primaires transfectées avec pMLT1, pMLTd197 et bc1051 ont été fixées avec une solution de formol-saline 10% et colorées au Giemsa dilué 1:5. Les cellules sont à confluence et clonent dans la boîte transfectée avec bc1051 (T moyen + petit T). Peu de colonies apparaissent, suite à la transfection avec pMLT1 (T moyen et grand T), alors que le nombre de colonies augmente plus de 10 fois par cotransfection de pMLTd197 (T moyen et grand T d197).

le petit T augmente la capacité du T moyen à immortaliser des cellules primaires en leur conférant un potentiel de croissance supérieur, et peut compléter le gène pmt in vitro.

Le gène plt ne peut pas compléter efficacement le gène pmt dans la transformation de cellules primaires. Nous avons obtenu peu de colonies résistantes au G-418 avec le recombinant pMLT1 (10 par transfection) (Figure 27), et aucune lignée n'a pu être gardée en culture (0/8). Cependant, nous avons déjà isolé des foyers transformés avec le plasmide pMLT1 dans un essai de formation de foyers. Nous avons transfecté des cellules primaires avec 8 µg de pMLT1, distribué celles-ci 1:5 et observé l'apparition de foyers. L'efficacité de transformation était très faible (seulement un foyer par transfection) mais, quand nous avons injecté 50,000 cellules transformées avec pMLT1 à des rats Fischer, nous avons obtenu 5 tumeurs sur 5 rats injectés, après un mois. Donc, plt peut compléter le gène pmt in vitro à une faible fréquence. Les gènes plt et pmt ensemble semblent avoir un effet antagoniste "toxique" sur la cellule. Toutefois, la transfection de cellules primaires avec pMLTd197 et pSV2neo donne près de 140 colonies résistantes au G-418 par transfection, soit 10 à 20 fois plus qu'avec pMLT1 (Figure 27). La majorité des colonies semble immortalisée et près de 5% de celles-ci (7 colonies sur 140) a un aspect transformé. 6 colonies sur 20 choisies au hasard se sont révélées être au moins immortalisées. Donc, pltd197 peut compléter le gène pmt dans la transformation de cellules primaires.

DISCUSSION

I. Activité oncogénique de l'antigène T moyen du virus du polyome.

Nous avons montré que la protéine T moyen du virus du polyome pouvait conférer à des lignées cellulaires établies un phénotype semblable à celui de cellules transformées par l'ADN de type sauvage. Les lignées cellulaires transformées par le gène pmt ont, en général, un pouvoir tumorigène réduit quand elles sont transplantées dans des souris nues ou des rats syngéniques. Ceci est dû à la variation dans les propriétés de croissance in vitro de ces lignées qui présentent un phénotype allant de presque normal à très transformé. Céline Gélinas (1984) a montré qu'il y avait une corrélation directe entre l'expression du gène T moyen, la tumorigénèse et les propriétés de croissance de ces lignées.

Même si le T moyen peut transformer des lignées cellulaires (Treisman et al., 1981b), nous avons trouvé qu'il était incapable d'induire la formation de tumeurs chez le rat. Toutefois, nous avons obtenu des tumeurs en injectant le clone T moyen dans des hamsters nouveau-nés après un temps de latence 5 à 10 fois plus long que celui observé avec l'ADN de type sauvage (Asselin et al., 1984). Topp et al. (1981) ont aussi observé le même phénomène suite à l'injection, dans des hamsters nouveau-nés, de l'ADN de certains mutants de SV40 n'exprimant que l'antigène grand T.

Rassoulzadegan et al. (1982) ont montré que le gène pmt était incapable d'induire la formation de foyers et de transformer de façon stable des cellules primaires d'embryons de rat. Toutefois, nous avons réussi à immortaliser, à une faible fréquence, des cellules primaires avec le gène pmt. Le phénotype des deux lignées immortalisées avec le gène pmt semble être relié à l'expression de la protéine T moyen. Spandidos et Wilkie (1984) ont montré que l'oncogène ras, qui est incapable de transformer des cellules primaires de rat (Land et al., 1983; Ruley, 1983; Newbold et Overell, 1983) pouvait induire la transformation de cellules primaires s'il était placé sous le contrôle de "enhancer" de transcription. L'immortalisation peut être obtenue avec le gène ras normal, s'il est placé sous le contrôle d'un "enhancer" de transcription. De la même façon, le gène pmt peut se comporter comme un gène immortalisant et sauver des cellules primaires de la sénescence si son expression est altérée.

Ces résultats montrent que le T moyen est principalement responsable du potentiel tumorigène du virus du polyome. Cependant, l'altération de la croissance cellulaire induite par cette protéine n'est pas toujours suffisante pour le développement de tumeurs, particulièrement dans un essai aussi rigoureux que l'injection d'ADN à des rongeurs nouveau-nés. Le fait que le gène pmt peut induire des tumeurs chez le hamster après un certain délai et immortaliser des cellules primaires de rat, peut être interprété par un processus de carcinogénèse à plusieurs étapes. L'expression du T moyen dans les cellules du nouveau-né ne serait pas suffisante pour induire la transformation parce que ces cellules ne possèdent pas les autres

fonctions virales complémentaires. Toutefois, l'acquisition subséquente d'altérations génétiques, probablement provoquées par l'expression du gène pmt et son effet pléiotropique sur les cellules, permettrait à celles-ci d'exprimer le phénotype transformé. Donc, l'antigène T moyen seul n'est pas suffisant pour induire le processus de tumorigénèse in vivo (Asselin et al., 1984) et in vitro (Rassoulzadegan et al., 1982). Des fonctions autres que celles exprimées par l'antigène T moyen sont requises pour l'élaboration de toutes les propriétés associées à la transformation néoplasique.

II. Complémentation par le gène grand T de polyome.

Nous avons montré que le gène plt pouvait compléter le gène pmt dans la transformation de la lignée cellulaire FR3T3. Les cellules transformées par les gènes plt et pmt sont plus tumorigènes que celles transformées avec le clone T moyen seul, mais elles n'acquièrent pas nécessairement la propriété de croissance à faible concentration de sérum. Même si l'indépendance à des facteurs de croissance exogènes n'est pas une conséquence invariable du transfert du gène plt, l'introduction du gène pmt lié à plt induit des transformants qui montrent les mêmes propriétés tumorigéniques que les cellules transformées par l'ADN de type sauvage. Il est peu probable que ces transformants proviennent de recombinaison entre les molécules transfectées parce qu'ils ont été obtenus sous les mêmes conditions utilisées avec la transformation par le gène pmt. Rassoulzadegan et al. (1981, 1982) ont montré que le gène plt, qui est incapable de transformer des cellules primaires mais qui peut leur conférer un

potentiel de croissance illimité (Rassoulzadegan et al., 1983), pouvait diminuer la dépendance au sérum de cellules transformées et normales. La contradiction entre ces résultats reflète probablement des différences dans la façon de sélectionner les transformants. Toutefois, nous avons observé, dans des cellules transformées avec pMLT1 (plt + pmt), une corrélation directe entre l'expression de l'antigène grand T de polyome, la croissance à faible concentration de sérum et la tumorigénicité, ce qui confirme les résultats de Rassoulzadegan et al. (1982). La dépendance de croissance à faible concentration de sérum et la tumorigénèse pourraient donc être complémentées par l'expression de l'antigène grand T.

La reconstitution de génomes de type sauvage par recombinaison homologue survient à de hautes fréquences (Miller et Temin, 1983; Pomerantz et al., 1983b) et l'argument utilisé pour la transfection de cellules in vitro ne prévaut pas nécessairement pour un processus aussi sélectif que la tumorigénèse par injection d'ADN in vivo. Dans nos études de complémentation in vivo, nous avons observé que des tumeurs pouvaient survenir comme résultat de recombinaison homologue entre des molécules d'ADN injectés (pmt et le mutant hr-t NG-18 dans le plasmide pMLT9) en restaurant un génome de polyome de type sauvage. Suite à ce résultat, nous avons vérifié le potentiel tumorigène d'un recombinant (pMLT1) dans lequel la recombinaison ne pouvait restaurer un génome de type sauvage, et nous avons été incapables d'induire de tumeurs chez le rat. Toutefois, un mutant avec une délétion en phase de 30 pb dans le gène plt et avec une capacité d'immortalisation accrue, plt-dl97, a complémenté très efficacement le T moyen dans la tumorigénèse in vivo.

Rassoulzadegan et al. (1982) ont trouvé que la cotransfection des gènes pmt et plt ne pouvait pas transformer des cellules primaires de rat. Nous avons cependant observé que la cotransfection de pmt et plt pouvait induire la transformation de cellules primaires de rat à une très faible fréquence et que ces cellules transformées étaient tumorigènes dans des rats syngéniques. Nous avons aussi trouvé qu'il était très difficile d'obtenir des lignées transformées avec pMLT1 (pmt + plt) alors que pMLTd197 (pmt + plt-dl97) donnait des lignées au moins immortalisées très facilement. Yamaizumi et al. (1983) ont rapporté un effet "toxique" sur la croissance de cellules de souris causé soit par l'expression du gène grand T, soit par la réplication de l'ADN plasmidique ou viral. Etant donné que nous avons trouvé que l'expression du phénotype immortalisé dans les cellules de rat exigeait une forte expression de l'antigène grand T de polyome très précocement, il ne semble pas que le grand T puisse être toxique pour la cellule dans ce cas. Il n'est pas exclus que la combinaison des gènes plt et pmt produise un effet "toxique" puisqu'il est difficile d'établir ces deux gènes dans des cellules primaires. Quelques laboratoires (Land et al., 1983; Mougneau et al., 1984) ont observé que le gène plt inhibait fortement l'établissement de gènes co-transfectés à cause de la présence de l'origine de réplication de polyome. On a suggéré que l'antigène grand T pouvait déclencher des rondes répétées de réplication et créer un effet cytopathique. Dans notre laboratoire, Judit Vass a trouvé que le mutant plt-dl97 ne se répliquait pas dans des cellules de souris. Il est donc possible que ce mutant immortalise mieux et complémente plus efficacement le gène pmt dans la tumorigénèse parce qu'il est dépourvu de capacité de réplication. Il est aussi possible que ce gène plt

mutant, qui est activé par la délétion, immortalise davantage à cause de la surexpression du gène par absence d'autorégulation. Kalderon et Smith (1984) ont obtenu des mutants de SV40 avec un phénotype supertransformant qui pourrait résulter de l'incapacité de ce groupe de mutants à réprimer la transcription du gène. Sans exclure un effet "toxique" possible de la réplication de l'ADN plasmidique par le gène *plt*, nous croyons que l'efficacité d'immortalisation ou de complémentation du gène *plt* ou du mutant *plt-dl97* dépend plus de leur expression et de l'obtention de niveaux permettant ces deux événements. Il est à noter que Rassoulzadegan et al. (1983) ont trouvé que l'expression du gène *plt* était nécessaire au maintien de l'état immortalisé et Petit et al. (1983) ont observé le même phénomène pour le grand T de SV40.

III. Complémentation par les antigènes précoces de SV40 et Ad2, et par l'oncogène cellulaire *myc*.

Nous avons montré que le pouvoir tumorigène du gène *pmt* in vivo pouvait être restauré par complémentation avec l'antigène grand T de SV40, ou sa région N-terminale, avec les produits de la région E1A de l'adénovirus 2 ou l'oncogène cellulaire *myc* (Asselin et al., 1984). De nombreux laboratoires ont montré que les propriétés oncogéniques des virus à ADN, comme le virus du papillome bovin (Schiller et al., 1984), le virus du polyome (Rassoulzadegan et al., 1982; Asselin et al., 1983; Cuzin et al., 1984) et l'adénovirus (pour une revue, voir Van der Eb et Bernards, 1984), dépendent de la synthèse de plusieurs produits de gènes des régions précoces qui peuvent se complémenter. Des essais de

complémentation entre différents oncogènes viraux ou cellulaires in vitro (Land et al., 1983; Ruley, 1983; Newbold et Overell, 1983) et in vivo (Asselin et al., 1984) ont permis de définir deux groupes de complémentation, chaque groupe représentant une étape différente requise pour la transformation de cellules primaires in vitro, ainsi que l'induction de tumeurs in vivo. L'oncogène ras et le gène pmt, qui sont incapables de transformer des cellules primaires de rat, peuvent transformer après cotransfert du gène grand T de polyome, de la région E1A de Ad2 ou de l'oncogène myc. Dernièrement, Parada et al. (1984) et Eliyahu et al. (1984) ont montré que le gène encodant la protéine cellulaire p53 pouvait compléter l'oncogène ras dans la transformation de cellules primaires de rongeurs. Le groupe de complémentation, composé des gènes plt de polyome, grand T de SV40, E1A de Ad2, c-myc et p53 possède des propriétés communes. Le gène plt ou sa région N-terminale (Rassoulzadegan et al., 1983), le gène grand T de SV40 ou sa région N-terminale (Colby et Shenk, 1982; Clayton et al., 1982; Petit et al., 1983), l'oncogène c-myc (Mougneau et al., 1984), la région E1A de Ad2 (Houweling et al., 1980) et le gène de la p53 (Jenkins et al., 1984) sont tous capables d'immortaliser des cellules primaires en culture. Ce sont des protéines à localisation nucléaire (Tooze, 1981; Donner et al., 1982; Jochemsen et al., 1982; Rotter et al., 1983), qui se lient à l'ADN (Donner et al., 1982; Wright et al., 1984) et à la matrice nucléaire (Covey et al., 1984; Eisenman et al., 1985). Elles ont un rôle à jouer dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Armelin et al., 1984; Mercer et al., 1984) ou dans la stimulation de gènes cellulaires (Scott et al., 1983; Svensson et Akusjärvi, 1984) et peuvent présenter des relations structurelles et fonctionnelles (Ralston et

Bishop, 1983; Bienz et al., 1984). L'action des gènes immortalisants se situerait dans le noyau, au niveau de l'induction ou de la répression de certains gènes cellulaires. L'autre classe d'oncogènes inclut l'oncogène ras et le gène pmt. Cette classe est impliquée dans l'acquisition d'altérations morphologiques et dans l'indépendance d'ancrage, et encode des produits localisés à la membrane plasmique (Willingham et al., 1981; Ito, 1979). De la même façon, nos études de complémentation in vivo suggèrent la classification des oncogènes viraux ou cellulaires en deux groupes de complémentation possédant des fonctions différentes, agissant sur des cibles différentes et qui définissent au moins deux étapes nécessaires dans la tumorigénèse. L'observation que le T moyen seul peut induire des tumeurs chez le hamster signifie que l'ordre temporel des deux événements a peu ou pas d'importance.

IV. Complémentation par l'antigène petit T.

Nous avons trouvé que l'antigène petit T pouvait compléter le gène pmt et produire des tumeurs chez le rat de façon aussi efficace que l'ADN de type sauvage. De plus, même si les lignées cellulaires FR3T3 transformées avec petit T et T moyen n'acquièrent pas nécessairement la propriété de croissance à faible concentration de sérum, celles-ci sont plus tumorigènes que les lignées transformées avec le T moyen seul. Nous avons aussi observé que le T moyen et le petit T pouvaient conférer un potentiel de croissance illimitée à des cellules primaires d'embryons de rat grâce à un pouvoir mitogène remarquable. Le petit T de polyome stimule la croissance de cellules normales quiescentes (Liang et al., 1984; Türlér et Salomon, 1985) et provoque

des changements structuraux à la surface de la cellule. Même si le petit T n'a pas de fonctions immortalisantes (Rassoulzadegan et al., 1983), il peut compléter le T moyen par son activité mitogénique. Les changements induits au niveau de la surface cellulaire par le petit T et au niveau du cytosquelette par le T moyen permettraient l'expression d'une fonction cellulaire pouvant fournir un potentiel de croissance illimité. Nos résultats in vitro diffèrent de ceux de Cuzin et al. (1984) qui ont été incapables de transformer des cellules primaires de rat avec le petit T et le T moyen. Ces auteurs ont suggéré que les trois antigènes précoces devaient être exprimés simultanément pour établir l'état transformé dans des cellules primaires de rat. La différence entre ces résultats proviendrait de la nature de l'essai utilisé (formation de foyers après fusion de protoplastes vs transformation au phosphate de calcium et sélection au G-418).

La capacité mitogénique du petit T de polyome est aussi reconnue pour le petit T de SV40. Celui-ci n'est pas requis pour la transformation morphologique dans un essai de formation de foyers mais augmente la capacité de l'antigène grand T de SV40 de faire croître des cellules en agar et d'obtenir l'indépendance d'ancrage (Rubin et al., 1982; Chang et al., 1984). In vivo, nous avons observé que le petit T de SV40 augmentait le pouvoir de complémentation du gène pmt par le grand T de SV40 (Asselin et al., 1984). Donc, dans un essai de croissance en agar ou dans un essai de tumorigénèse in vivo, le petit T de SV40 ou de polyome serait nécessaire à une stimulation métabolique continue. Leur action pourrait être directe ou indirecte, par l'interaction avec des protéines cellulaires (Yang et al., 1979). Sompayrac et Danna (1983) ont

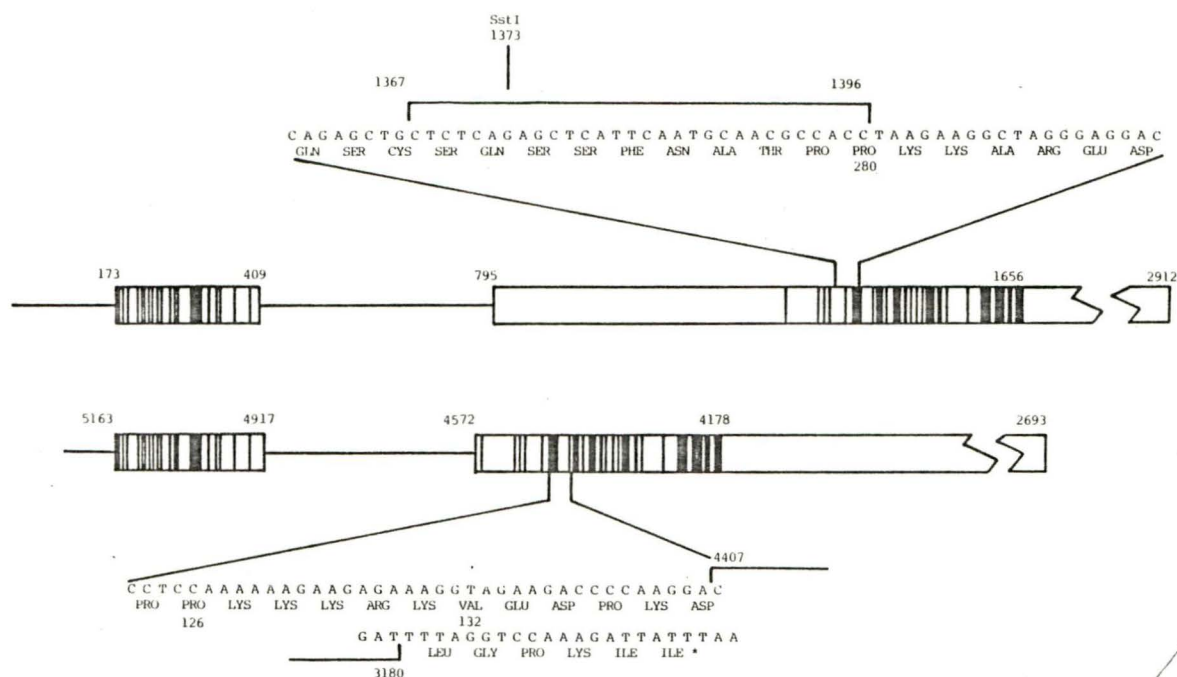


FIG. 28. Comparaison de l'homologie en acides aminés des gènes grand T de SV40 et polyome et des mutants plt-d197 et Xho24. Les régions codantes des antigènes grand T sont représentées (en haut, plt; en bas grand T de SV40). Les régions codantes par les boîtes et les introns, par les traits simples. Les régions noircies montrent les homologies de séquences en acides aminés entre les deux antigènes et les régions incolores représentent les régions de non-homologie. La séquence en acide aminé de la portion C-terminale du mutant du gène grand T de SV40 est indiquée avec l'étendue de la délétion ainsi que les acides aminés résultant du changement de cadre de lecture. Les acides aminés délétés dans le mutant plt-d197 sont aussi indiqués, avec pour chacun, leur position dans les antigènes.

montré que le petit T de SV40 pouvait fournir au moins une des fonctions requises pour le maintien de la transformation. Il est à noter que le petit T est une protéine riche en cystéine dont la séquence est comparable à celle de certaines hormones (Friedmann et al., 1978). Même si, opérationnellement, le petit T de polyome est très similaire dans la tumorigénèse aux facteurs d'immortalisation (antigènes grand T, E1A, c-myc, p53), il ne peut être impliqué dans des fonctions d'établissement ou d'immortalisation. Ceci suggère que tous les gènes qui complètent la fonction transformante de l'antigène T moyen de polyome ne créent pas des changements identiques dans le comportement cellulaire mais peuvent, au contraire, interagir avec des cibles cellulaires différentes. Le petit T appartient donc à un groupe de complémentarité différent de ceux qui ont été déjà décrits.

V. Immortalisation de cellules primaires de rat avec des mutants de délétion des gènes grand T de polyome et de SV40.

Nous avons trouvé que 27% de la région codante du gène grand T de polyome, jusqu'au nucléotide 1213 (site HpaII), était suffisant à immortaliser des cellules primaires de rat. Cette séquence contient la région N-terminale entre les nt 173 et 409, homologue à celle de SV40, et une région unique au virus du polyome, entre les nt 795 et 1213. La région immortalisante essentielle serait située entre les nt 1016 (AvaI) et 1213 puisque des mutants, qui ont perdu ces séquences, sont inactifs dans l'essai d'immortalisation. Le virus du polyome contient donc des séquences importantes à l'immortalisation entre les nt 795 et 1213, sans homologie avec celles de SV40, et qui seraient possiblement d'origine

cellulaire (Soeda et al., 1980). Ces séquences, traduites dans deux cadres de lecture différents, seraient importantes pour la fonction de deux protéines, soit le grand T et le T moyen. Cette région de la protéine, dépourvue de structure secondaire particulière (Bob Kamen, communication personnelle), ne contient aucune séquence spécifique de protéines qui se lient à l'ADN, telle que définie par Pabo et Sauer (1984). Cette protéine nucléaire, dont la seule activité enzymatique associée est une ATPase (Gaudray et al., 1980), a une affinité non-spécifique pour l'ADN cellulaire et spécifique pour les régions régulatrices de l'ADN du virus du polyome (Gaudray et al., 1981; Pomerantz et al., 1983a). Elle est impliquée dans l'établissement (Fried, 1965) et le maintien de la transformation cellulaire (Seif et Cuzin, 1977; Trejo-Avila et al., 1981) et de l'immortalisation (Rassoulzadegan et al., 1983). Nilsson et Magnusson (1984) ont analysé les propriétés biochimiques de divers mutants de délétion du gène *plt* situés dans la région que nous avons identifiée comme étant importante à l'immortalisation. Le mutant dl1041, dont les séquences entre les nt 962 et 1338 sont délétées, se lie faiblement à l'ADN du virus *in vitro* et est positif dans la répllication. Le mutant dl2208 (délétion de 1125 à 1183) est localisé à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau et est légèrement surexprimé. Le mutant in1351 (délétion à partir de 1337), qui n'encode que les 260 premiers acides aminés de la protéine, ne montre pas de liaison spécifique à l'ADN. Comme la protéine se retrouve dans le noyau, les auteurs ont suggéré que ce fragment de la protéine doit avoir une affinité non-spécifique pour l'ADN. Ces résultats suggèrent que les séquences retrouvées dans la région nécessaire à l'immortalisation seraient importantes dans la localisation de la protéine au noyau, dans

l'autorégulation des gènes précoces et dans la liaison non-spécifique à l'ADN. Ces fonctions seraient importantes dans l'immortalisation de cellules primaires par le gène *plt* et ses mutants de délétion. Au moins, nous pouvons dire que la fonction de maintien de l'immortalisation est séparée de l'activité du gène *plt* qui contrôle la réplication de l'ADN viral puisque la partie amino-terminale de la protéine est suffisante à l'immortalisation.

Nous avons trouvé qu'un mutant de délétion du gène grand T de SV40, Xho24, qui n'encode que les 137 premiers acides aminés, soit 19% de la protéine, pouvait immortaliser efficacement des cellules primaires de rat. Nous avons mis en évidence une protéine de 20KD dans les cellules immortalisées par ce mutant. D'autres laboratoires ont déterminé que la région N-terminale de la protéine (jusqu'au nt 3733) pouvait immortaliser des cellules primaires de rat (Colby et Shenk, 1982; Clayton et al., 1982) ou de souris (Tevethia, 1984) et que l'expression du gène grand T de SV40 était nécessaire au maintien de l'état immortalisé (Petit et al., 1983). Cette région est cependant beaucoup plus grande (361 acides aminés, 51% de la protéine) que la région minimale que nous avons défini. Une différence remarquable dans l'immortalisation entre le gène grand T tronqué de SV40 et le gène *plt* de polyome est que les lignées cellulaires établies après le transfert du gène tronqué de SV40 présentent différents niveaux de transformation alors que les lignées immortalisées suite à l'introduction du gène *plt* sont normales, sauf pour l'indépendance à des facteurs sériques. La différence serait peut-être due à la présence de la protéine cellulaire p53. Celle-ci forme un complexe non-covalent avec la protéine grand T de

SV40. Quand la protéine p53 se lie au grand T, sa demi-vie augmente considérablement. Ceci entraîne l'accumulation de la protéine qui joue un rôle dans la stimulation de la croissance de cellules quiescentes (Mercer et al., 1984) et qui peut immortaliser des cellules primaires (Jenkins et al., 1984). En analysant les résultats de Colby et Shenk (1982), on observe une corrélation entre la quantité de p53 et la capacité des cellules immortalisées avec la région amino-terminale de la protéine grand T, de croître en agar. Cependant, la p53 ne semble pas être stabilisée par la protéine tronquée puisque la quantité de p53 varie considérablement selon les lignées. De plus, la région C-terminale de l'antigène grand T semble être essentielle à la formation d'un complexe stable avec la protéine p53 (Chaudry et al., 1982). On s'attendrait que le mutant Xho24 ne stabilise pas la p53 puisqu'il ne contient pas les séquences nécessaires à la stabilisation. Or, on observe quand même une bande qui comigre à 53K dans les cellules immortalisées avec Xho24. Sompayrac et al. (1983) ont montré que la stabilisation de la p53 n'était pas requise pour la transformation par SV40. Cela laisse supposer que les niveaux de p53 retrouvés dans la lignée Xho24 ou dans celles isolées par Colby et Shenk (1982) pourraient être le résultat de l'immortalisation, et non la cause. Comme dans le cas de Colby et Shenk (1982), nous n'avons noté aucune corrélation évidente entre le potentiel de croissance et la grandeur ou la stabilité des fragments de l'antigène grand T produits par nos divers mutants. La variation dans le phénotype des lignées immortalisées proviendrait de contributions significatives mais non-uniformes par des produits de gènes cellulaires. Une contribution majeure des produits de gènes cellulaires au phénotype des cellules transformées par SV40, dans

certains cas, pourrait aussi expliquer le fait que quelques (mais pas toutes) lignées transformées par des virus qui encodent un antigène grand T thermosensible (mutants tsA) sont T-indépendants pour le maintien de l'état transformé (Tegtmeyer, 1975; Seif et Cuzin, 1977).

Si la p53 n'est pas impliquée, quelles sont les fonctions présentes dans le mutant Xho24 qui permettraient l'immortalisation? La protéine grand T de SV40 est suffisante pour induire et maintenir le phénotype transformé dans plusieurs types de cellules en culture (Tooze, 1981). Plusieurs propriétés biochimiques ont été assignées à différents domaines de la protéine: une activité ATPase (Tjian et Robbins, 1979), une affinité pour l'ADN cellulaire (Carroll et al., 1974), pour l'origine de répllication de SV40 (Tjian, 1978) et pour la protéine p53 (Lane et Crawford, 1979; Linzer et Levine, 1979). L'expression de l'antigène grand T stimule la répllication de l'ADN cellulaire (Tjian et al., 1978), active la transcription des gènes ribosomiaux et autres gènes cellulaires (Soprano et al., 1979; Scott et al., 1983) et stimule la production de facteurs de croissance (Kaplan et al., 1981). Des analyses biochimiques et génétiques de divers mutants ont révélé que la fonction répllicative de l'antigène grand T n'était pas essentielle au processus de transformation et que ni la liaison spécifique à l'origine de répllication, ni l'activité ATPase n'étaient nécessaires à l'activité transformante (Gluzman et Ahrens, 1982; Stringer, 1982; Prives et al., 1983; Manos et Gluzman, 1984, 1985). Un mutant du gène grand T de SV40, dl1138, qui a une délétion à partir du nt 4340, ne conserve aucune des activités associées au gène grand T, telle que la liaison à l'origine de répllication, l'activité ATPase, la répllication de l'ADN viral, la

stimulation de la synthèse de l'ADN cellulaire et l'activation de la synthèse des ARNr (Clark et al., 1983; Pipas et al., 1983; Soprano et al., 1983). Ceci implique que notre mutant Xho24, qui immortalise avec des séquences en 5' du nt 4408, devrait avoir perdu ces propriétés biochimiques. La région N-terminale est cependant importante dans la liaison spécifique à l'ADN. Les 130 acides aminés N-terminaux de la protéine grand T, particulièrement les acides aminés 83 à 130 après l'intron, peuvent se lier à l'ADN bicaténaire de thymus de veau, et aussi à l'origine de réplication de l'ADN viral et ce, de façon spécifique (Prives et al., 1982; Chaudry et al., 1982; Morrison et al., 1983). Cette région comporte aussi une séquence d'acides aminés basiques, entre les résidus 127 et 131, qui est un signal de localisation nucléaire. La conversion de la lysine 128 en thréonine (Kalderon et al., 1984a, 1984b; Kalderon et Smith, 1984), en asparagine (Lanford et Butel, 1984), ou une délétion en phase de 120 pb qui enlève les sites HinfI à 4459 et 4376 (Fantuzzi et Vesco, 1984) empêche la protéine grand T d'entrer dans le noyau. Ces mutants sont capables de transformer des cellules en culture. Nous avons trouvé qu'un mutant de SV40, dont le grand T ne pouvait entrer dans le noyau (Lanford et Butel, 1984) transformait des cellules primaires de rat et complétait le gène T moyen de polyome avec une efficacité plus faible que celle de l'ADN de type sauvage. Il est possible que les activités biochimiques de la protéine, comme sa localisation à la membrane, (Soule et Butel, 1979) soient suffisantes à la transformation de cellules primaires. Une petite quantité de la protéine pourrait se retrouver dans le noyau, sans pouvoir être détectée, et être suffisante à la transformation. Il se pourrait aussi que le petit T produit par le mutant puisse compléter

le grand T et permettre la transformation. Ces résultats indiquent qu'un besoin absolu d'un antigène grand T nucléaire n'est pas nécessaire dans tous les cas de transformation cellulaire. Le mutant Xho24 conserve les séquences nécessaires à l'entrée dans le noyau. La protéine tronquée produite par ce mutant est toutefois assez petite pour ne pas nécessiter ces séquences.

Wright et al. (1984) ont montré que la protéine grand T de SV40 était capable de reconnaître et de se lier à la séquence consensus 5'-GAGGC-3' trouvé dans l'ADN provenant de plusieurs sources. Ce pentanucléotide constitue la séquence de liaison de la protéine grand T à l'origine de réplication de SV40 (De Lucia et al., 1983). Comme SV40 induit la transcription de gènes spécifiques dans les cellules de souris transformées (Schutzbank et al., 1982; Scott et al., 1983), il est possible que cette induction soit provoquée par l'interaction spécifique de l'antigène grand T de SV40 ou d'une protéine tronquée (Xho24) avec des séquences cellulaires, surtout que Xho24 conserve des séquences importantes dans la liaison spécifique à l'ADN. Des résultats, qui montrent que des mutants défectifs dans la réplication ou dans la liaison spécifique à l'origine de réplication peuvent transformer, vont à l'encontre d'un rôle important de la liaison spécifique à l'ADN dans la transformation. Cette hypothèse reste possible parce que les essais d'immunoprécipitation mesurent une liaison très forte à l'ADN, ce qui donnerait peut-être une plus grande importance à une liaison moins spécifique à l'ADN dans le processus d'activation de gènes et dans la transformation. La liaison à l'ADN ne serait pas suffisante pour obtenir une transformation complète mais pourrait être une étape nécessaire dans le processus d'immortalisation conférée par le mutant Xho24.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements au Dr Marcel Bastin, mon directeur de thèse, pour les discussions fructueuses, les nombreux conseils et l'aide précieuse qu'il m'a prodigués au cours de ce travail.

Je tiens aussi à remercier l'Institut National du Cancer du Canada pour le support financier.

Je voudrais également remercier toutes les personnes qui m'ont assisté dans ce travail:

- Le Dr Pierre Chartrand, pour les nombreuses discussions et son appui.

- Le Dr John Hassell, pour l'apprentissage de la technique d'immunoprécipitation.

- Le Dr Philip Branton pour sa collaboration dans le travail sur la complémentation entre pmt et Ad2.

- Mesdames Johanne Toutant et Carole Bergeron qui m'ont apporté une aide technique inestimable.

- Mesdemoiselles Louise Bouchard, Céline Gélinas et Claude Roberge et Mesdames Judit Vass et Annick Ratiarson, pour leur collaboration et pour de nombreuses discussions.

- Mademoiselle Andrée Houle, pour la dactylographie de ce travail.

REFERENCES

1. Armelin, H.A., Armelin, M.C.S., Kelly, K., Stewart, T., Leder, P., Cochran, B.H. and Stiles, C.D. (1984) Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor. *Nature* 310:655-660.
2. Asselin, C., Gélinas, C. and Bastin, M. (1983) Role of the three polyoma virus early proteins in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 3:1451-1459.
3. Asselin, C., Gélinas, C., Branton, P.E. and Bastin, M. (1984) Polyoma middle T antigen requires cooperation from another gene to express the malignant phenotype in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 4:755-760.
4. Basilico, C., Matsuya, Y. and Green, H. (1970) The interaction of polyoma virus with mouse-hamster somatic hybrid cells. *Virology* 41:295-305.
5. Bendig, M.M., Thomas T. and Folk, W. R. (1980) Viable deletion mutant in the medium and large T-antigen-coding sequences of the polyoma virus genome. *J. Virol.* 33:1215-1220.
6. Benjamin, T.L. (1970) Host range mutants of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 67:394-399.
7. Benjamin, T.L., Carmichael, G.G. and Schaffhausen, B.S. (1979) The hr-t gene of polyoma virus. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 44:263-270.
8. Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D. and Oren, M. (1984) Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *EMBO J.* 3:2179-2183.
9. Bikel, I., Roberts, T.M., Bladon, M.T., Green, R., Amann, E. and Livingston, D.M. (1983) Purification of biologically active simian virus 40 small tumor antigen.
10. Bolen, J.B., Thiele, C.J., Israel, M.A., Yonemoto, W., Lipsich, L.A. and Brugge, J.S. (1984) Enhancement of cellular src gene product associated tyrosyl kinase activity following polyoma virus infection and transformation. *Cell* 38:767-777.
11. Bouchard, L., Gélinas, C., Asselin, C. and Bastin, M. (1984) Tumorigenic activity of polyoma virus and SV40 DNAs in newborn rodents. *Virology* 135:53-64.
12. Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.

13. Brady, J., Bolen, J.B., Radonovich, M., Salzman, N. and Khoury, G. (1984) Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:2040-2044.
14. Carmichael, G.G. and Benjamin, T.L. (1980) Identification of DNA sequence changes leading to loss of transforming ability in polyoma virus. *J. Biol. Chem.* 255:230-235.
15. Carmichael, G.G., Schaffhausen, B.S., Dorsky, D.I., Oliver, D.B. and Benjamin, T.L. (1982) Carboxy terminus of polyoma middle-sized tumor antigen is required for attachment to membranes associated protein kinase activities, and cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 79:3579-3583.
16. Carroll, R.B., Hager, L. and Dulbecco, R. (1974) Simian virus 40 T antigen binds to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 71:3754-3757.
17. Chang, L.-S., Pater, M.M., Hutchinson, N.I. and Di Mayorca, G. (1984) Transformation by purified early genes of simian virus 40. *Virology* 133:341-353.
18. Chaudry, F., Harvey, R. and Smith, A.E. (1982) Structure and biochemical functions of four simian virus 40 truncated large-T antigens. *J. Virol.* 44:54-66.
19. Clark, R., Peden, K., Pipas, J.M., Nathans, D. and Tjian, R. (1983) Biochemical activities of T-antigen proteins encoded by simian virus 40 A gene deletion mutants. *Mol. Cell. Biol.* 3:220-228.
20. Clayton, C.E., Murphy, D., Lovett, M. and Rigby, P.W.J. (1982) A fragment of the SV40 large T-antigen gene transforms. *Nature* 299:59-61.
21. Cogen, B. (1978) Virus-specific early RNA in 3T6 cells infected by a ts mutant of polyoma virus. *Virology* 85:222-230.
22. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 69(8):2110-2114.
23. Colby, W.W. and Shenk, T. (1982) Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 79:5189-5193.
24. Courtneidge, S.A. and Smith, A.E. (1983) Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. *Nature* 303:435-439.
25. Courtneidge, S.A. and Smith, A.E. (1984) The complex of polyoma virus middle-T antigen and pp60 ^{c-src}. *EMBO J.* 3:585-591.

26. Covey, L., Choi, Y. and Prives, C. (1984) Association of simian virus T antigen with the nuclear matrix of infected and transformed monkey cells. *Mol. Cell. Biol.* 4:1384-1392.
27. Cowie, A. and Kamen, R. (1984) Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J. Virol.* 52:750-760.
28. Curatolo, L., Erba, E. and Morasca, L. (1984) Culture conditions induce the appearance of immortalized C₃H mouse cell lines. *In Vitro* 20:597-601.
29. Cuzin, F. (1984) The polyoma virus oncogenes. Coordinated functions of three distinct proteins in the transformation of rodent cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 781:193-204.
30. Cuzin, F., Rassoulzadegan, M. and Lemieux, L. (1984) Multigenic control of tumorigenesis: three distinct oncogenes are required for transformation of rat embryo fibroblasts by polyoma virus. *Oncogenes and Viral genes, Cancer cells* 2:109-116.
31. De Lucia, A.L., Lewton, B.A., Tjian, R. and Tegtmeyer, P. (1983) Topography of simian virus A protein-DNA complexes: arrangement of pentanucleotide interaction sites at the origin of replication. *J. Virol.* 46:143-150.
32. Deppert, W. and Walter, G. (1982) Domains of simian virus 40 large T-antigen exposed on the cell surface. *Virology* 122:56-70.
33. Dilworth, S.M., Cowie, A., Kamen, R.I. and Griffin, B.E. (1984) DNA binding activity of polyoma virus large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 81:1941-1945.
34. Di Mayorca, G., Callender, J., Marin, G. and Giordano, R. (1969) Temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Virology* 38:126-133.
35. Ding, D., Dilworth, S.M. and Griffin, B.E. (1982) mlt mutants of polyoma virus. *J. Virol.* 44:1080-1083.
36. Donner, P., Greiser-Wilke, I. and Moelling, K. (1982) Nuclear localization of DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296:262-266.
37. Eckhart, W. (1969) Complementation and transformation by temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Virology* 38:120-125.
38. Eisenman, R.N., Tachibana, C.Y., Abrams, H.D. and Hann, S.R. (1985) v-myc- and c-myc- encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.* 5:114-126.
39. Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. and Oren, M. (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312:646-649.

40. Fantuzzi, L.F. and Vesco, C. (1984) Molecular cloning and restriction mapping of a simian virus 40 deletion mutant derived from simian transformants expressing a non-karyophilic T antigen. *FEBS Lett.* 170:125-130.
41. Fluck, M.M., Staneloni, R.J. and Benjamin, T.L. (1977) Hr-t and ts-a: two early gene functions of polyoma virus. *Virology* 77:610-624.
42. Francke, B. and Eckhart, W. (1973) Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology* 55:127-135.
43. Fried, M. (1965) Cell-transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 53:486-491.
44. Friedmann, T., La Porte, P. and Esty, J.A. (1978) Nucleotide sequence studies of polyoma DNA. *J. Biol. Chem.* 253:6561.
45. Garcea, R.L. and Benjamin, T.L. (1983) Host range transforming gene of polyoma virus plays a role in virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 80:3613-3617.
46. Gaudray, P., Clertant, P. and Cuzin, F. (1980) ATP phosphohydrolase (ATPase) activity of a polyoma virus T-antigen. *Eur. J. Biochem.* 109:553-560.
47. Gaudray, P., Tyndall, C., Kamen, R. and Cuzin, F. (1981) The high affinity binding site of polyoma virus DNA for the viral large-T protein. *Nuc. Acids Res.* 9(21):5697-5710.
48. Gélinas, Céline (1984) Structure et fonction du gène transformant du virus du polyome. Thèse de Ph.D.
49. Gélinas, C., Chartrand, P. and Bastin, M. (1982) Polyoma virus mutant with normal transforming activity but impaired tumorigenic potential. *J. Virol.* 43:1072-1081.
50. Gluzman, Y. and Ahrens, B. (1982) SV40 early mutants that are defective for viral DNA synthesis but competent for transformation of cultured rat and simian cells. *Virology* 123:78-92.
51. Graessmann, A., Graessmann, M., Tjian, R. and Topp, W.C. (1980) Simian virus 40 small-T protein is required for loss of actin cable networks in rat cells. *J. Virol.* 33:1182-1191.
52. Gray, H.B. Jr., Winson, T.P., Hodnett, J.L., Legerski, R.J., Nees, D.W., Wei, C. and Robberson, D.L. (1981) In: *Gene amplification and analysis*, Vol. 2. Structural analysis of nucleic acids, J.G. Chirikjian and T.S. Papas (eds.), North Holland: Elsevier Press, p. 169-203.

53. Griffin, B.E. and Dilworth, S.M. (1983) Polyomavirus: an overview of its unique properties. *Adv. Cancer. Res.* 39:183-268.
54. Griffin, B.E., Ito, Y., Novak, U., Spurr, N., Dilworth, S., Smolar, N., Pollack, R., Smith, K. and Rifkin, D.B. (1980) Early mutants of polyoma virus (dl8 and dl23), with altered transformation properties: is polyoma virus middle T antigen a transforming gene product? *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:271-283.
55. Griffin, B.E. and Maddock, C. (1979) New classes of viable deletion mutants in the early region of polyoma virus. *J. Virol.* 31:645-656.
56. Grodzicker, T., Anderson, C., Sambrook, J. and Mathews, M.B. (1977) Conditional lethal mutants of adenovirus type 2 - simian virus 40 hybrids. II. Ad2⁺ND1 host-range mutants that synthesize fragments of the Ad2⁺ND1 30 K protein. *J. Virol.* 19:559-571.
57. Gross, L. (1953a) A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83:414.
58. Gross, L. (1953b) Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation in early infancy with filtered (Berkeley N), or centrifuged (144,000 X/g) Ak-leukemic extracts. *Cancer* 6:948.
59. Habel, K. (1965) Specific complement-fixing antigens in polyoma tumors and transformed cells. *Virology*, 25:55.
60. Hassell, J.A., Topp, W.C., Rifkin, D.B. and Moreau, P.E. (1980). Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragments containing only part of the early region. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 77:3978-3982.
61. Hattori, J., Carmichael, G.G. and Benjamin, T.L. (1979) DNA sequence alterations in hr-t deletion mutants of polyoma virus. *Cell* 16:505-513.
62. Houweling, A., Van der Elsen, P.J. and Van der Eb, A. (1980) Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* 105:537-550.
63. Hutchinson, M.A., Hunter, T. and Eckhart, W. (1978) Characterization of T-antigens in polyoma-infected and transformed cells. *Cell* 15:65-77.
64. Israël, M.A., Chowdhury, K., Ramseur, J., Chandrasekaran, K., Vanderryn, D.F. and Martin, M.A. (1979a) Tumorigenicity of polyoma virus in hamsters. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 44:591-596.

65. Israël, M.A., Simmons, D.T., Hourihan, S.L., Rowe, W.P. and Martin, M.A. (1979b). Interrupting the early region of polyoma virus DNA enhances tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76:3713-3716.
66. Ito, Y. (1979) Polyoma virus-specific 55K protein isolated from plasma membrane of productively infected cells is virus-coded and important for cell transformation. *Virology* 98:261-266.
67. Ito, Y., Brocklehurst, J.R. and Dulbecco, R. (1977) Virus-specific proteins in the plasma membrane of cells lytically infected or transformed by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 74:4666-4670.
68. Jenkins, J.R., Rudge, K. and Currie, G.A. (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312:651-653.
69. Jochemsen, H., Daniëls, G.S.G., Hertoghs, J.J.L., Schrier, P.I., Van der Elsen, P.J. and Van der Eb, A.J. (1982) Identification of adenovirus type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* 122:15-28.
70. Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.E. and Smith, A.E. (1984a) Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311:33-38.
71. Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D. and Smith, A.E. (1984b) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.
72. Kalderon, D. and Smith, A.E. (1984) In vitro mutagenesis of a putative DNA binding domain of SV40 large-T. *Virology* 139:109-137.
73. Kamen, R., Favalaro, J., Parker, R., Treisman, R., Lania, L., Fried, M. and Mellor, A. (1980) Comparison of polyoma virus transcription in productively infected mouse cells and transformed rodent cell lines. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:63-75.
74. Kaplan, P.L., Topp, W.C. and Ozanne, B. (1981) Simian virus 40 induces the production of transforming factor(s). *Virology* 108:484-490.
75. Keller, J.M. and Alwine, J.C. (1984) Activation of the simian virus 40 late promoter: direct effects of the T antigen in the absence of viral DNA replication. *Cell* 36:381-389.
76. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
77. Land, H., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596-602.

78. Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T-antigen is bound to a protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.
79. Lanford, R.E. and Butel, J.S. (1984) Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37:801-813.
80. Liang, T.J., Carmichael, G.G. and Benjamin, T.L. (1984) A polyoma mutant that encodes small T antigen but not middle T antigen demonstrates uncoupling of cell surface and cytoskeletal changes associated with cell transformation. *Mol. Cell. Biol.* 4:2774-2783.
81. Linzer, D.I.H. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.
82. Magnusson, G. and Berg, P. (1979) Construction and analysis of viable deletion mutants of polyoma virus. *J. Virol.* 32:523-529.
83. Magnusson, G., Nillson, M.G., Dillworth, S.M. and Smolar, N. (1981) Characterization of polyoma mutants with altered middle and large T-antigens. *J. Virol* 39(3):673-683.
84. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
85. Manos, M.M. and Gluzman, Y. (1984) Simian virus 40 large T-antigen point mutants that are defective in viral DNA replication but competent in oncogenic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 4:1125-1133.
86. Manos, M.M. and Gluzman, Y. (1985) Genetic and biochemical analysis of transformation-competent, replication-defective simian virus 40 large T antigen mutants. *J. Virol.* 53:120-127.
87. Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65:499-560.
88. May, P., May, E. and Borde, J. (1976) Stimulation of cellular RNA synthesis in mouse kidney cell cultures infected with SV40 virus. *Exp. Cell Res.* 100:433-436.
89. Mercer, W.A., Avignolo, C. and Baserga, R. (1984) Role of the p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Biol.* 4:276-281.
90. Mes, A.M. and Hassell, J.A. (1982) Polyoma viral middle-T antigen is required for transformation. *J. Virol.* 42:621-629.
91. Miller, C.K. and Temin, H.M. (1983) High efficiency ligation and recombination of DNA fragments by vertebrate cells. *Science* 220:606-609.

92. Montano, X. and Lane, D.P. (1984) Monoclonal antibody to simian virus 40 small t. *J. Virol.* 51:760-767.
93. Morrison, B., Kress, M., Khoury, G. and Jay, G. (1983) Simian virus 40 tumor antigen: isolation of the origin-specific DNA-binding domain. *J. Virol.* 47:106-114.
94. Mougneau, E., Lemieux, L. Rassoulzadegan, M. and Cuzin, F. (1984) Biological activities of v-myc and rearranged c-myc oncogenes in rat fibroblast cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 81:5758-5762.
95. Newbold, R.E. and Overell, R.W. (1983) Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature* 304:648-651.
96. Nilsson, S.V. and Magnusson, G. (1983) T-antigen expression by polyoma mutants with modified RNA splicing. *EMBO J.* 2:2095-2101.
97. Nilsson, S.V. and Magnusson, G. (1984) Activities of polyomavirus large-T-antigen proteins expressed by mutant genes. *J. Virol.* 51:768-775.
98. Novak, U., Dilworth, S.M. and Griffin, B.E. (1980) Coding capacity of a 35% fragment of the polyoma virus genome is sufficient to initiate and maintain cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 77:3278-3282.
99. Novak, U. and Griffin, B.E. (1981) Requirement for the C-terminal region of middle T-antigen in cellular transformation by polyoma virus. *Nuc. Acids Res.* 9:2055-2073.
100. Pabo, C.O. and Sauer, R.T. (1984) Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 53:293-321.
101. Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D. and Rotter, V. (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312:649-651.
102. Parent, C. and Bastin, M. (1981) Cloning of a defective polyoma DNA molecule with rearrangements in the region coding for middle and large T antigens. *FEBS Lett.* 130:269-271.
103. Petit C.A., Gardes, M. and Feunteun, J. (1983) immortalization of rodent embryo fibroblasts by SV40 is maintained by the A gene. *Virology* 127:74-82.
104. Pipas, J.M., Peden, K.W.C. and Nathans, D. (1983) Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: isolation and characterization of mutants with deletions in the T-antigen gene. *Mol. Cell. Biol.* 3:203-213.

105. Pomerantz, B.J., Mueller, C.R. and Hassell, J.A. (1983a) Polyomavirus large T antigen binds independently to multiple, unique regions on the viral genome. *J. Virol.* 47:600-610.
106. Pomerantz, B.J., Naujokas, M. and Hassell, J.A. (1983b) Homologous recombination between transfected DNAs. *Mol. Cell. Biol.* 3:1680-1685.
107. Prives, C., Barnet, B., Scheller, A., Khoury, G. and Jay, G. (1982) Discrete regions of simian virus 40 large T antigen are required for nonspecific and viral origin-specific DNA binding. *J. Virol.* 43:73-82.
108. Prives, C., Covey, L., Scheller, A. and Gluzman, Y. (1983) DNA-binding properties of simian virus 40 T-antigen mutants defective in viral DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 3:1958-1966.
109. Ralston, R. and Bishop, J.M. (1983) The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1A are structurally related. *Nature* 306:803-806.
110. Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R. and Cuzin, F. (1982) The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300:713-718.
111. Rassoulzadegan, M., Gaudray, P., Canning, M., Trejo-Avila, L. and Cuzin, F. (1981) Two polyoma virus gene functions involved in the expression of the transformed phenotype in FR 3T3 rat cells. I. Localization of a transformation maintenance function in the proximal half of the large T coding region. *Virology* 114:489-500.
112. Rassoulzadegan, M., Mougneau, E., Perbal, B., Gaudray, P., Birg, F. and Cuzin, F. (1980) Host-virus interactions critical for cellular transformation by polyoma virus and simian virus 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44:333-342.
113. Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, R. and Cuzin, F. (1983) Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 80:4354-4358.
114. Rotter, V., Abutbul, H. and Ben-Zeev, A. (1983) p53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *EMBO J.* 2:1041-1047.
115. Rowe, D.T., Yee, S.-P., Otis, J., Graham, F.L. and Branton, P.E. (1983) Characterization of human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides using antitumor sera and an antiserum specific for the carboxy terminus. *Virology* 127:253-271.

116. Rubin, H., Figge, J., Bladon, M.T., Chen, L.B., Ellman, M., Bikel, I., Farrell, M. and Livingston, D.M. (1982) Role of small t antigen in the acute transforming activity of SV40. *Cell* 30:469-480.
117. Ruley, H.E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304:602-606.
118. Rundell, K. (1982) Presence in growth-arrested cells of cellular proteins that interact with simian virus 40 small-t antigen. *J. Virol.* 42:1135-1137.
119. Schaffhausen, B.S. and Benjamin, T.L. (1979) Phosphorylation of polyoma T antigens. *Cell* 18:935-946.
120. Schaffhausen, B.S. and Benjamin, T.L. (1981) Protein kinase activity associated with polyoma virus middle T antigen. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.* 8:1281-1296.
121. Schiller, J.T., Vass, W.C. and Lowy, D.R. (1984) Identification of a second transforming region in bovine papillomavirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 81:7880-7884.
122. Schutzbank, T. Robinson, R., Oren, M. and Levine, A.J. (1982) SV40 large tumor antigen can regulate some cellular transcripts in a positive fashion. *Cell* 30:481-490.
123. Scott, M.R.D., Westphal, K.-H. and Rigby, P.W.J. (1983) Activation of mouse genes in transformed cells. *Cell* 34:557-567.
124. Seif, R. and Cuzin, F. (1977) Temperature-sensitive growth regulation in one type of transformed rat cells induced by the tsa mutant of polyoma virus. *J. Virol.* 24:721-728.
125. Shyamala, M., Atcheson, C.L. and Kasamatsu, H. (1982) Stimulation of host centriolar antigen in TC7 cells by simian virus 40: requirement for RNA and protein synthesis and an intact simian virus 40 small-t gene function. *J. Virol.* 43:721-729.
126. Silver, J., Schaffhausen, B. and Benjamin, T.L. (1978) Tumor antigens induced by non-transforming mutants of polyoma virus. *Cell* 15:485-496.
127. Sleight, M.J., Topp, W.C., Hanick, R. and Sambrook, J.F. (1978) Mutants of SV40 with an altered small T protein are reduced in their ability to transform cells. *Cell* 14:79-88.
128. Smart, J.E. and Ito, Y. (1978) Three species of polyoma virus tumor antigens share common peptides probably near the amino termini of the proteins. *Cell* 15:1427-1437.

129. Smolar, N. and Griffin, B.E. (1981) DNA sequences of polyoma virus early deletion mutants. *J. Virol.* 38:958-967.
130. Soeda, E., Arrand, J.R., Smolar, N., Walsh, J.E. and Griffin, B.E. (1980) Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283:445-453.
131. Sompayrac, L. and Danna, K.J. (1983) A simian virus 40 dl884/tsA58 double mutant is temperature sensitive for abortive transformation. *J. Virol.* 46:620-625.
132. Sompayrac, L.M., Gurney, E.G. and Danna, K.J. (1983) Stabilization of the 53,000-dalton nonviral tumor antigen is not required for transformation by simian virus 40. *Mol. Cell. Biol.* 3:290-296.
133. Soprano, K.J., Dev, V.G., Croce, C.M. and Baserga, R. (1979) Reactivation of silent rRNA genes by simian virus 40 in human-mouse hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76:3885-3889.
134. Soprano, K.J., Galanti, N., Jonak, G.J., McKercher, S., Pipas, J.M., Peden, K.W.C. and Baserga, R. (1983) Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: stimulation of cellular DNA synthesis and activation of rRNA genes by mutants with deletions in the T-antigen gene. *Mol. Cell. Biol.* 3:214-219.
135. Soule, H.R. and Butel, J.S. (1979) Subcellular localization of SV40 large tumor antigen. *J. Virol.* 30:523-532.
136. Southern, P.J. and Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341.
137. Spandidos, D.A. and Wilkie, N.M. (1984) Malignant transformation of early passage rodent cells by a single mutated human oncogene. *Nature* 310:469-475.
138. Stewart, S.E. and Eddy, B.E. (1959) Properties of a tumor-inducing virus recovered from mouse neoplasms. In: *Perspectives in virology* (ed. M. Pollard), vol. I, p. 245. Wiley, New York.
139. Stow, N.D. and Wilkie, N.M. (1976) An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex virus type 1 DNA. *J. Gen. Virol.* 33:447-458.
140. Stringer, J.R. (1982) Mutant of simian virus 40 large T-antigen that is defective for viral DNA synthesis, but competent for transformation of cultured rat cells. *J. Virol.* 42:854-864.
141. Svensson, C. and Akusjärvi, G. (1984) Adenovirus 2 early region 1A stimulates expression of both viral and cellular genes. *EMBO J.* 3:789-794.

142. Tegtmeier, P. (1975) Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. *J. Virol.* 10:591-598.
143. Templeton, D. and Eckhart, W. (1982) Mutation causing premature termination of the polyoma virus medium T antigen blocks cell transformation. *J. Virol.* 41:1014-1024.
144. Tevethia, M.J. (1984) immortalization of primary mouse embryo fibroblasts with SV40 virions, viral DNA, and a subgenomic DNA fragment in a quantitative assay. *Virology* 137:414-421.
145. Tjian, R. (1978) The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein. *Cell* 13:165-179.
146. Tjian, R., Fey, G. and Graessmann, A. (1978) Biological activity of purified simian virus 40 T-antigen proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 75:1279-1283.
147. Tjian, R. and Robbins, A. (1979) Enzymatic activities associated with a purified simian virus 40 T antigen-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 76:610-614.
148. Tooze, J. (ed.) (1981) DNA tumor viruses: Molecular biology of tumor viruses. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
149. Topp, W.C., Rifkin, D.B. and Sleight, M.J. (1981) SV40 mutants with an altered small-t protein are tumorigenic in newborn hamsters. *Virology* 111:341-350.
150. Treisman, R., Cowie, A., Favaloro, J., Jat, P. and Kamen, R. (1981a) The structures of the spliced mRNAs encoding polyoma virus early region proteins. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:83-92.
151. Treisman, R., Novak, U., Favaloro, J. and Kamen, R. (1981b) Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only the middle-T protein. *Nature* 292:595-600.
152. Trejo-Avila, L., Gaudray, P. and Cuzin, F. (1981) Two polyoma virus gene functions involved in the expression of the transformed phenotype in FR 3T3 rat cells. II. The presence of the 56K middle-T protein in the cell membrane is not sufficient for maintenance. *Virology* 114:501-506.
153. Türler, H. and Salomon, C. (1985) Small and middle T antigens contribute to lytic and abortive polyomavirus infection. *J. Virol.* 53:579-586.
154. Van der Eb, A. and Bernards, R. (1984) Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110:23-51.

155. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. and Axel, R. (1978) Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14:725-731.
156. Willingham, M.C., Pastan, I., Shih, T.Y. and Scolnick, E.M. (1981) Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 19:1005-1014.
157. Wright, P.J., DeLucia, A.L. and Tegtmeyer, P. (1984) Sequence-specific binding of simian virus 40 A protein to nonorigin and cellular DNA. *Mol. Cell. Biol.* 4:2631-2638.
158. Yamaizumi, M., Horwich, A.L. and Ruddle, F.H. (1983) Expression and stabilization of microinjected plasmids containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene and polyoma virus DNA in mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* 3:511-522.
159. Yang, Y.-C., Hearing, P. and Rundell, K. (1979) Cellular proteins associated with simian virus 40 early gene products in newly infected cells. *J. Virol.* 32:147-154.
160. Yousaf, S.I., Carroll, A.R. and Clarke, B.E. (1984) A new and improved method for 3'-end labeling DNA using [α -³²P] ddATP. *Gene* 27:309-313.
161. Zhu, Z., Veldman, G.M., Cowie, A., Carr, A., Schaffhausen, B. and Kamen, R. (1984) Construction and functional characterization of polyomavirus genomes that separately encode the three early proteins. *J. Virol.* 51:170-180.